

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie,
Molekulare Diagnostik - Zentrallaboratorium
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. Harald Renz

in Zusammenarbeit mit dem
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg

Thrombin-Generierung durch Asparaginase

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Danuta Chalkitis
aus Bottrop

Marburg 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 28.09.2012

Gedruckt mit freundlicher Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: PD Dr. med. T. Stief

Korreferent: PD Dr. med. T. Zeiler

Meinen treuen, strahlenden und wegweisenden Klinikengeln

Thomas, Siegfried, Sylvia

gewidmet

Summary

The bacterial enzyme asparaginase is an important antineoplastic drug used for the treatment of a variety of lymphoproliferative disorders and lymphomas, in particular acute lymphoblastic leukemia.

Its capacity to modulate the plasmatic coagulation is a known clinical complication. As a side effect the asparaginase might pathologically activate or inactivate the intrinsic coagulation.

The aim of the present research work is to analyze the action of different asparaginase drugs on the plasmatic thrombin generation in 118 individual normal plasma samples using the new ultra specific, ultra-sensitive and precise thrombin generation test recalcified coagulation activity assay (RECA).

Three different asparaginases were utilized for the laboratory analytical experiments; two native *Escherichia coli* (*E. coli*) asparaginases and an *E. coli* asparaginase coupled to polyethylene glycol (PEG-asparaginase). The two native *E. coli* asparaginases only differed in their time of production (the first lot produced would be referred to as the old lot, whereas the second lot produced would be called the new lot).

The RECA diagnosed the coagulation modulating (especially the prothrombotic) power of the present asparaginases. Therefore, the approximate (approx.) 200 % stimulatory concentration (SC200) or the approx. 50 % inhibitory concentration (IC50) was determined. The SC200 is the plasmatic asparaginase concentration that results in 200 % of the original thrombin generation. The IC50 is the asparaginase concentration that results in only 50 % of the original thrombin generation.

The supplemented plasmas became procoagulant or anticoagulant, or stayed resistant to hemostasis modulation by asparaginase. The old lot asparaginase was procoagulant in every plasma sample with approx. SC200-values of 5.8 ± 5.4 unit per milliliter (U/ml) (mean value \pm 1 standard deviation) [MV \pm 1 SD].

By contrast, only 51 % of the plasma samples that were supplemented with the new lot asparaginase became procoagulant, 24.5 % of the supplemented plasmas had a combination of SC200 and IC50 (depending

on coagulation reaction time), 21 % had just an IC₅₀ (MV = 6 U/ml) and 3,5 % of the plasmas were resistant towards modulation of coagulation.

This means that the new lot has less thrombotic potential compared to the old one. In contrast the analyzed IC₅₀-values point out that it could have an anticoagulant effect on the plasmatic blood coagulation of the individual patient, which could lead to bleeding complications.

The PEG-asparaginase has been described as a modified molecule of asparaginase with less side effects than unmodified native asparaginase. The comparative plasma samples supplemented with both asparaginase preparations demonstrated no difference between the native *E. coli* asparaginase and the PEG-asparaginase with regard to the blood coagulation. The approx. SC₂₀₀-values of both asparaginases correlated with a correlation coefficient greater than 0.9. This high correlation and the similar mean values indicated, that respective plasmatic thrombin generation the rather expensive modified PEG-asparaginase behaved similar as the native asparaginase.

Thus the hemostatic system of every patient responds individually to certain asparaginase preparations. Using the RECA, the patient's individual coagulation triggering response to asparaginase can be previewed and the drug dosage could be adjusted: it is suggested to diagnose the patient's individual coagulation response to bacterial asparaginase prior to and during the administration of the drug. Patients with an increased risk for asparaginase-induced thrombosis should be treated with prophylactic to therapeutic concentrations of low molecular weight heparin (LMWH).

Inhaltsverzeichnis

Summary	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1. Einleitung	1
1.1 Asparaginase	1
1.1.1 Geschichte der Asparaginase.....	2
1.1.2 Gewinnung der Asparaginase	3
1.1.3 Gebrauch der Asparaginase im klinischen Alltag	4
1.1.4 Struktur der Asparaginase	8
1.1.5 Pharmakodynamik.....	11
1.1.6 Pharmakokinetik	14
1.1.7 Therapeutische Bedeutung der Asparaginase.....	15
1.1.8 Nebenwirkungen.....	17
1.2 Die Hämostase.....	21
1.2.1 Gliederung der Hämostase.....	22
1.2.2 Die intrinsische Blutgerinnungskaskade	25
1.2.3 Thrombin	29
1.3 Antikoagulantien.....	32
2. Zielstellung und Folgerung.....	35
3. Material und Methoden.....	37
3.1 Verwendete Materialien.....	37
3.2 Verwendete Methoden: RECA (recalcified coagulation activity assay).....	38
3.3 Versuchsdurchführung	40
3.3.1 RECA unter Zugabe nativer <i>E. coli</i> Asparaginase zu normalen Plasmaproben	40
3.3.2 RECA unter Zugabe nativer <i>E. coli</i> Asparaginase gleicher Produktart, aber mit älterem Herstellungsdatum, zu normalen Plasmaproben	41

3.3.3 RECA unter Zugabe von modifizierter <i>E. coli</i> Asparaginase (PEG-Asnase) und nativer <i>E. coli</i> Asparaginase zu normalen Plasmaproben	41
3.3.4 RECA unter Zugabe von Enoxaparin und Asparaginase zu normalen Plasmaproben	42
3.4 Versuchsauswertung: Bestimmung der SC200- und IC50-Konzentration	42
4. Ergebnisse	44
4.1 RECA mit Plasmaproben unter Zugabe von nativer <i>E. coli</i> Asparaginase (neue Charge).....	46
4.2 RECA mit Plasmaproben unter Zugabe von nativer <i>E. coli</i> Asparaginase gleicher Produktart, aber mit unterschiedlichem Herstellungsdatum (alte Charge)	80
4.3 RECA mit Plasmaproben unter Zugabe von PEG-Asparaginase im Vergleich zur nativen <i>E. coli</i> Asparaginase.....	102
4.4 RECA mit Plasmaproben unter Zugabe von nativer <i>E. coli</i> Asparaginase und zusätzlicher Gabe von niedermolekularem Heparin	113
5. Diskussion	115
6. Zusammenfassung	121
7. Literaturverzeichnis.....	123
8. Anhang	147
Tabellarischer Lebenslauf	147
Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	148
Danksagung.....	149
Ehrenwörtliche Erklärung	151

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Quaternäre Struktur der <i>E. coli</i> Asparaginase nach Michalska & Jaskolski, 2006	8
Abbildung 2: Molekulare Struktur der Asparaginase nach Goodsell, 2005	9
Abbildung 3: Wirkungsweise der Asparaginase modifiziert nach Narta <i>et al.</i> , 2007	12
Abbildung 4: Therapeutischer Wirkmechanismus der Asparaginase modifiziert nach Müller & Boos, 1998	13
Abbildung 5: Dynamik der Blutgerinnung modifiziert nach Spronk <i>et al.</i> , 2003	22
Abbildung 6: Schematische Darstellung der endogenen und exogenen Gerinnungskaskade modifiziert nach Arbogast, 2004	24
Abbildung 7: Das intrinsische System als Abfolge proteolytischer Reaktionen modifiziert nach Gailani, 2007	26
Abbildung 8: Schematisches Diagramm der Blutgerinnungskaskade mit ihrem Schlüsselenzym Thrombin modifiziert nach Gentry, 2004	32
Abbildung 9: Molekulargewichtsverteilung von Heparin und niedermolekularem Heparin nach Harenberg & Fenyesi, 2004	33
Abbildung 10: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	49
Abbildung 11: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	50
Abbildung 12: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	51
Abbildung 13: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	52
Abbildung 14: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	53
Abbildung 15: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	54
Abbildung 16: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	55
Abbildung 17: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	56
Abbildung 18: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	57
Abbildung 19: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	58

Abbildung 20: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	59
Abbildung 21: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	60
Abbildung 22: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	61
Abbildung 23: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	62
Abbildung 24: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	63
Abbildung 25: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	64
Abbildung 26: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	65
Abbildung 27: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	66
Abbildung 28: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	67
Abbildung 29: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	68
Abbildung 30: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	69
Abbildung 31: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	70
Abbildung 32: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	71
Abbildung 33: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	72
Abbildung 34: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	73
Abbildung 35: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	74
Abbildung 36: Durchschnittswert der Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration in Plasmapools	75
Abbildung 37: Durchschnittswerte der Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	76
Abbildung 38: Durchschnittsthrombinaktivitäten aller Proben mit einer Asparaginase-SC200 in Abhängigkeit der Thrombinkonzentration	77
Abbildung 39: Durchschnittsthrombinaktivitäten aller Proben mit einer Asparaginase-IC50 in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	78

Abbildung 40: Durchschnittsthrombinaktivitäten aller Proben mit einer Asparaginase-IC50 und -SC200 in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	79
Abbildung 41: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	83
Abbildung 42: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	84
Abbildung 43: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	85
Abbildung 44: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	86
Abbildung 45: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	87
Abbildung 46: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	88
Abbildung 47: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	89
Abbildung 48: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	90
Abbildung 49: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	91
Abbildung 50: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	92
Abbildung 51: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	93
Abbildung 52: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	94
Abbildung 53: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	95
Abbildung 54: Durchschnittswerte der Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	96
Abbildung 55: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	97
Abbildung 56: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	98
Abbildung 57: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	99
Abbildung 58: Thrombin-Generierung in Frischplasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	100
Abbildung 59: Thrombin-Generierung in Frischplasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration.....	101

Abbildung 60: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	105
Abbildung 61: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	106
Abbildung 62: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	106
Abbildung 63: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	107
Abbildung 64: Durchschnittswerte der Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	107
Abbildung 65: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	108
Abbildung 66: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	108
Abbildung 67: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	109
Abbildung 68: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	109
Abbildung 69: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	110
Abbildung 70: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	110
Abbildung 71: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	111
Abbildung 72: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration	111
Abbildung 73: Vergleich der Thrombin-Generierung in individuellen normalen Plasmaproben, die mit Asparaginase oder PEG-Asparaginase versetzt wurden.....	112
Abbildung 74: Vergleich der Thrombin-Generierung in individuellen normalen Plasmaproben, die mit Asparaginase oder PEG-Asparaginase versetzt wurden.....	112
Abbildung 75: Prävention der Asparaginase-induzierten pathologischen Thrombin-Generierung durch LMWH.....	114
Abbildung 76: Prävention der Asparaginase-induzierten pathologischen Thrombin-Generierung durch LMWH.....	114

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich von modifizierter und nativer Asparaginase nach Narta <i>et al.</i> , 2007	10
Tabelle 2: Halbwertszeiten unterschiedlicher Asparaginasepräparationen nach Narta <i>et al.</i> , 2007	15
Tabelle 3: Schema zum recalcified coagulation activity assay nach Stief, 2009	39
Tabelle 4: Auswertung der 57 Plasmaproben zugesetzt mit nativer <i>E. coli</i> Asparaginase	46
Tabelle 5: Ergebnisse der alten Charge Asparaginase nach Zusatz zu 46 individuellen Plasmaproben.....	80
Tabelle 6: Ergebnisse der Frischplasmaprobe zugesetzt mit der alten und neuen Charge der nativen <i>E. coli</i> Asparaginase	82
Tabelle 7: Ermittelte SC200- und IC50-Werte der 14 Plasmaproben unter Zusatz nativer <i>E. coli</i> Asparaginase und PEG-Asnase	102
Tabelle 8: Plasmaproben 1-4 jeweils versetzt mit <i>E. coli</i> Asnase und PEG-Asparaginase und die dazugehörigen analysierten SC200- und IC50-Werte.....	103
Tabelle 9: Prozentualer Anteil aller analysierten Plasmaproben, die eine SC200 oder IC50 hatten.....	104

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALL	akute lymphatische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
AML	akute myeloische Leukämie
approx.	approximative
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ASN	Asparagin
Asnase	Asparaginase
AT	Antithrombin
ATP	Adenosintriphosphat
$\Delta A/t$	Absorption pro Zeit
ca.	circa
Ca^{2+}	Calcium-Ionen
CaCl_2	Calciumchlorid
Conc.	Konzentration
CRT	coagulation reaction time
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EXCA	extrinsic coagulation activity assay
F	Faktor
HIT	Heparin induzierte Thrombozytopenie
HK	hochmolekulares Kininogen
HMWK	high molecular weight kininogen
HWZ	Halbwertszeit
IC50	50 % inhibitory concentration
i.m.	intramuskulär

IU	international unit
IU/mg	international unit pro Milligramm
IU/ml	international unit pro Milliliter
IU/m ²	international unit pro Quadratmeter
i.v.	intravenös
K	Kallikrein
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten Konstante
LMWH	low molecular weight heparin
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
M	Mol
mA	milli-absorbance
Min	Minute
mIU/ml	Milli-international unit pro Milliliter
mM	Millimol
mmol/l	Millimol pro Liter
MV	mean value
NaCl	Natriumchlorid
NH ₃	Ammoniak
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
nm	Nanometer
NMH	niedermolekulares Heparin
PDIC	pathologic disseminated intravascular coagulation
PEG	Polyethylenglykol
PK	Präkallikrein

PL	Phospholipid
PP	Diphosphat
PT	Prothrombinzeit
r	Korrelationskoeffizient
RECA	recalcified coagulation activity assay
s.c.	subkutan
SC200	200 % stimulatory concentration
SD	Standardabweichung
TF	tissue factor
U	unit
UFH	unfraktioniertes Heparin
U/kg	unit pro Kilogramm
U/l	unit pro Liter
U/m ²	unit pro Quadratmeter
U/ml	unit pro Milliliter

1. Einleitung

1.1 Asparaginase

Asparaginase (Asnase) ist ein Enzym, das unter Ammoniak-Freisetzung die Hydrolyse von Asparagin oder Glutamin zu Aspartat oder Glutamat katalysiert (Piatkowska-Jakubas *et al.*, 2008). In der Medizin wird es aus Bakterien gewonnen und als Zytostatikum therapeutisch eingesetzt (Müller & Boos, 1998).

Asnase ist ein sehr effektives antineoplastisches Agens gegen viele lymphoproliferative Erkrankungen und Lymphome. Es wird u.a. bei der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie (ALL), der häufigsten Krebserkrankung von Kindern, eingesetzt (Narta *et al.*, 2007).

Das Enzym wird für gewöhnlich als Teil einer Kombinationschemotherapie mit anderen Medikamenten zur Induktion einer Remission bei ALL-Patienten verabreicht. Die wichtigsten Zytostatika zur Remissionsinduktion sind Vincristin, Kortikosteroide, Anthrazykline und Asnase (Ortega *et al.*, 1977; Ertel *et al.*, 1979). Dabei ist die Reihenfolge der verwendeten Medikamente in den Behandlungsplänen von großer Bedeutung. Asnase vor Methotrexatgabe wirkt antagonistisch, während Asnase nach Methotrexatgabe synergistisch wirkt (Capizzi, 1974; Avramis & Panosyan, 2005).

Das Enzym hat sich seit mehr als 30 Jahren in der Therapie pädiatrischer lymphoproliferativer Erkrankungen etabliert und wird als fester Bestandteil in vielen aktuellen Behandlungsprotokollen eingesetzt (Jones *et al.*, 1977; Ortega *et al.*, 1977; Clavell *et al.*, 1986; Amylon *et al.*, 1999; Hann *et al.*, 2000). Daneben findet es ebenfalls Bedeutung in der Therapie der ALL bei Erwachsenen (Larson *et al.*, 1995; Gokbuget & Hoelzer, 2002).

Als Zytostatikum hat sich die Asnase sowohl während der Induktion als auch bei den darauffolgenden Phasen einer Chemotherapie als äußerst effektiv erwiesen (Clavell *et al.*, 1986; Amylon *et al.*, 1999; Silverman *et al.*, 2001; Duval *et al.*, 2002).

Der Hauptnachteil der Asparaginase sind auftretende sogenannte Hypersensitivitätsreaktionen, welche 3 - 78 % der Patienten mit der

unmodifizierten Form des Enzyms entwickeln (Killander *et al.*, 1976; Clavell *et al.*, 1986; Müller *et al.*, 2001). Zudem sind die häufigen intramuskulären Injektionen von Nachteil (Nesbit *et al.*, 1979; Narta *et al.*, 2007).

Mit Einführung der Polyethylenglykol (PEG)-modifizierten Form des Enzyms, PEG-Asparaginase als Alternative, wurde versucht dem entgegnenzusteuern (Ashihara *et al.*, 1978; Müller *et al.*, 2000; Vieira Pinheiro *et al.*, 2001; Schellekens, 2002; Harris & Chess, 2003; Rizzari *et al.*, 2006).

1.1.1 Geschichte der Asparaginase

Die Asparaginase wurde als potenzielles Zytostatikum vor ungefähr 45 Jahren entdeckt (Oettgen *et al.*, 1967).

Clementi fand eine sehr hohe Asparaginaseaktivität im Blut-Plasma von Meerschweinchen, wohingegen andere Säugetiere wie auch der Mensch nicht diese Aktivität im Blut-Plasma aufwiesen (Clementi, 1922). Im Jahre 1953 entdeckte Kidd, dass Meerschweinchensera, im Gegensatz zu Pferde- und Hasensera, das Wachstum von Lymphsarkomen in Mäusen und Ratten unterdrückte (Kidd, 1953a; Kidd, 1953b).

1961 verglich Broome Kiddy Ergebnisse mit denen von Clementi. Ihm gelang der erfolgreiche Nachweis, dass die antineoplastische Wirkung des Meerschweinchenserums der in ihm vorhandenen Asparaginase zuzuschreiben ist. Zusätzliche Untersuchungen bestätigten dies (Broome, 1963a; Broome, 1963b).

Im weiteren Verlauf wurde das Enzym auch aus *Escherichia coli* (*E. coli*) und anderen Bakterien isoliert, wobei sich die *E. coli* Asparaginase am wirksamsten gegen ALL und Lymphome herausstellte (Mashburn & Wriston, 1964; Campbell & Mashburn, 1969).

Beim Einsatz der Asnase als potenzielles Zytostatikum war es nicht so, dass man zuerst erkannte, dass Tumorzellen einen niedrigen Asparagin-Synthethasespiegel besitzen und die in der wissenschaftlichen Forschung tätigen Ärzte deswegen die Asparaginase in die Tumorthherapie einführen sollten. Man entdeckte zuerst eine erfolgreiche Behandlungsmethode und arbeitete sich dann zurück, um darzulegen, warum sie Erfolg zeigte (Narta *et al.*, 2007).

1.1.2 Gewinnung der Asparaginase

Die ersten Studien, die die Effektivität des Enzyms bewiesen, wurden mit aus Meerschweinchenserum gewonnener Asparaginase durchgeführt (Yellin & Wriston, 1966a; Yellin & Wriston, 1966b). Allerdings ist die Gewinnung von ausreichend großen Mengen des Enzyms aus Meerschweinchenserum problematisch. Asparaginase kommt natürlicherweise nicht beim Menschen vor. Obwohl sie sich in zahlreichen Pflanzen, Pilzen und Tieren wiederfindet (Grover, 1927; Altenbern & Housewright, 1954), erweist sich die schwere Extraktionsprozedur als ein Problem (Narta *et al.*, 2007).

Im Jahre 1964 berichteten Mashburn und Wriston über eine gelungene Extraktion von Asparaginase aus *E. coli*, die über eine ähnliche Wirkung, wie die aus dem Meerschweinchenserum gewonnene, verfügte (Mashburn & Wriston, 1964). Campbell *et al.* erzielten auf der Suche nach zusätzlichen Gewinnungsmöglichkeiten der Asnase vergleichbare Ergebnisse und identifizierten zwei unterschiedliche Formen, die unter dem Namen Typ 1 und Typ 2 bekannt wurden (Campbell *et al.*, 1967).

Typ 1 Asparaginase wird grundlegend im Zytoplasma produziert. Sie ist charakterisiert durch eine enzymatische Aktivität gegenüber Asparagin und Glutamin. Typ 2 wird unter anaeroben Bedingungen im periplasmatischen Raum der Bakterienmembran produziert. Das Enzym hat eine sehr hohe spezifische Aktivität gegen Asparagin (ASN), aufgrund dieser es sich auch in der Therapie maligner Neoplasien als Chemotherapeutikum durchgesetzt hat (Campbell & Mashburn, 1969; Verma *et al.*, 2007).

Mikroorganismen haben sich als sehr effiziente und kostengünstige Quelle dieses Enzyms erwiesen. Die Einfachheit, mit der sie kultiviert werden können, hat die Massenproduktion des Enzyms deutlich erleichtert. Eine große Reihe von Mikroben einschließlich Bakterien, Pilzen, Hefen, Aktinomyzeten und Algen sind sehr effiziente Produzenten des Enzyms (Grover & Chibnall, 1927; Gorr & Wagner, 1932; Manning, 1957; Broome, 1965). Trotzdem haben sich die Asparaginase, die von den beiden Bakterienstämmen *E. coli* und *Erwinia carotovora* (später als *Erwinia chrysanthemi* bezeichnet) isoliert wurden, etabliert, da sie die geringste

Toxizität unter der großen Auswahl an ähnlichen Enzymen mit bekannter antineoplastischen Wirkung aufweisen (Asselin *et al.*, 1993b; Duval *et al.*, 2002).

Die aus beiden Quellen gewonnenen Enzyme haben einen identischen Wirkungsmechanismus und größtenteils die gleichen Nebenwirkungen. Sie unterscheiden sich jedoch in der Pharmakodynamik (Eden *et al.*, 1990; Duval *et al.*, 2002).

Patienten, die auf die eine Asparaginasepräparation allergisch reagieren, können auf die andere umgestellt werden (Evans *et al.*, 1982; Aghaiypour, *et al.*, 2001; Papageorgiou *et al.*, 2008).

1.1.3 Gebrauch der Asparaginase im klinischen Alltag

Heutzutage sind drei verschiedene Asparaginase im klinischen Gebrauch. Zwei unmodifizierte (native) Formen und eine modifizierte Form.

In Deutschland sind derzeit drei verschiedene Asparaginasepräparate im Einsatz.

- 1) Asparaginase medac® : Die native Asparaginase aus *E. coli*
- 2) Erwinase® : Die native Asparaginase aus *Erwinia chrysanthemi*
- 3) Oncaspar® : Die native *E. coli* Asparaginase, kovalent verknüpft mit Monomethoxy-Polyethylenglykol (PEG).

In den USA sind zwei Formen des Präparats erhältlich. Elspar® aus *E. coli* und dessen pegylierte Form Oncaspar®. Im Gegensatz zu Deutschland wurde im Juli 2006 in den USA die PEG-Asparaginase für die Erstlinienbehandlung von Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie zugelassen. Durch die Pegylierung und die damit verbundene verlängerte Halbwertszeit (HWZ) kann Oncaspar® in geringerer Dosis als Elspar® verabreicht werden und verursacht scheinbar weniger allergische Reaktionen (Dinndorf *et al.*, 2007, Van den Berg, 2011).

1.1.3.1 Native, unmodifizierte Asparaginase

Die nativen unmodifizierten Asparaginase, die dem klinischen Gebrauch zur Verfügung stehen, stammen von zwei unterschiedlichen Bakterien-

stammen, hauptsächlich werden sie aber aus *E. coli* extrahiert (Narta *et al.*, 2007).

Asparaginase medac® wird aus dem Bakterienstamm *Escherichia coli* gewonnen, wohingegen die *Erwinia* Asparaginase Erwinase® von dem Bakterium *Erwinia chrysanthemi* stammt. Sie besitzt im Vergleich zur erstgenannten den Vorteil, weniger allergische Reaktionen hervorzurufen (Eden *et al.*, 1990; Avramis *et al.*, 2002; Duval *et al.*, 2002; Moghrabi *et al.*, 2007). Daneben scheint sie weniger ausgeprägte Folgen auf die Gerinnungsproteine zu haben (Risseuw-Appel *et al.*, 1994; Carlsson *et al.*, 1995; Nowak-Göttl *et al.*, 1997), was andere Studien aber nicht belegen (Castaman & Rodeghiero, 1993; Albertsen *et al.*, 2001).

Das Enzym besitzt im Vergleich zur *E. coli* Asparaginase den Nachteil, dass es nicht so aktiv und manchmal schwierig zu erhalten ist (Duval *et al.*, 2002).

Bei einem für Erwinase und *E. coli* Asparaginase identischen Dosierungsschema von 10.000 unit pro Quadratmeter (U/m^2) intravenös konnte eine vollständige Asparaginasedepletion in über 90 % der *E. coli* Asparaginase Proben und nur in 26 % der Erwinase Proben nachgewiesen werden (Pinheiro & Boos, 2004).

Die Ergebnisse des Dana-Farber Cancer Institute ALL Konsortium Protokolls 95-01 für Kinder mit ALL bestätigen, dass *Erwinia* Asnase bei einmal wöchentlicher Gabe während der Konsolidierung signifikant weniger toxisch, aber auch weniger effektiv als *E. coli* Asnase ist (Goldberg *et al.*, 2003; Moghrabi *et al.*, 2007).

1.1.3.2 Native, modifizierte Asparaginasen, Polyethylenglykol-Asparaginase

Da die Therapie der Asparaginase durch eine hohe Immunogenität, angefangen von leichten allergischen Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock und einer sehr kurzen Halbwertszeit (HWZ) begrenzt wurde (Uren, 1977), sind in den 70er Jahren zahlreiche Versuche unternommen worden, die Asparaginase chemisch mit unterschiedlichen Methoden zu modifizieren, um ein besseres Behandlungsergebnis zu erzielen (Distasio *et al.*, 1976).

Erwünschte Eigenschaften der Asparaginase beinhalten eine hohe Asparaginspezifität, eine niedrige Glutaminspezifität, eine lange HWZ und eine niedrige immunogene Wirkung (Avramis & Tiwari, 2006).

Verschiedene Arbeitsgruppen unternahmen den Versuch, eine Form von Asparaginase zu identifizieren, die weniger Immunogenität erzeugt, aber gleichzeitig ihre antineoplastische Wirkung beibehält (Abuchowski *et al.*, 1979; Uren & Ragin, 1979).

Zahlreiche entwickelte Asnase mit guten katalytischen Eigenschaften wurden klinischen Studien unterzogen, konnten sich aber aufgrund ihrer therapeutischen Insuffizienz nicht durchsetzen (Narta *et al.*, 2007).

Ab den 70er Jahren wurde die PEG-Asnase entwickelt und anschließend klinischen Studien unterworfen, um ihre Effektivität zu beweisen (Muss *et al.*, 1990; Aguayo *et al.*, 1999; Silverman *et al.*, 2001).

Bei Testung des neuen Medikaments im Rahmen der Therapie rezidivierender ALL bei Kindern (Ettinger *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 2000; Jarrar *et al.*, 2006), in deren Induktionstherapie (Avramis *et al.*, 2002) und in der von Erwachsenen (Holowiecki *et al.*, 2003; Rosen *et al.*, 2003; Douer, *et al.*, 2007) wurden positive Ergebnisse erzielt. PEG-Asnase wirkte sowohl in Tierversuchen (Abuchowski *et al.*, 1979) als auch bei Menschen (Jürgens *et al.*, 1988) antineoplastisch. In Kombination mit Methotrexat wurden hohe Raten an Remissionsinduktionen und ein verlängertes leukämiefreies Überleben gesichert (Capizzi, 1975). Des Weiteren wurde eine reduzierte Immunogenität in vivo durch Studien bestätigt (Mac Ewen *et al.*, 1987; Ettinger *et al.*, 1995).

Die PEG-Asnase wird durch kovalente Verknüpfung von Monomethoxy-Polyethylenglykol an native *E. coli* Asnase hergestellt. Polyethylenglykole sind nicht toxische wasserlösliche Polymere, die den hydrodynamischen Radius des Medikaments vergrößern, die Proteolyse und renale Ausscheidung verringern und das Präparat vor Erkennung des Immunsystems schützen. Durch die Pegylierung des nativen Enzyms werden dessen immunogene Epitope blockiert, was die allergischen Reaktionen reduziert, während die Enzymaktivität erhalten und die antineoplastische Wirkung nicht modifiziert/verändert wird (Ho *et al.*, 1986; Keating *et al.*, 1993; Ettinger *et al.*, 1995; Fu & Sakamoto, 2007).

Die PEG-Asnase besitzt im Vergleich zur nativen *E. coli* Asparaginase ähnliche biochemische Eigenschaften. Sie verfügt jedoch über eine deutlich längere HWZ als das native Enzym, wodurch es seltener und in niedrigeren Dosen eingesetzt werden muss (Graham, 2003; Pinheiro & Boos 2004, Rytting, 2010).

Studien konnten zeigen, dass eine Einzeldosis von 1000 - 2500 U/m² in den meisten Patienten zu einer kompletten Asparagin-Depletion für ca. drei bis vier Wochen führt (Douer *et al.*, 1997; Avramis *et al.*, 2002). Unter der Annahme, dass mit sorgfältigem Drugmonitoring geringere Dosen erfolgreich appliziert werden könnten, wiesen Vieira Pinheiro *et al.* nach, dass mit einer Dosis von 500 U/m² eine Serum-Asparaginaseaktivität > 100 unit pro Liter (U/l) für mindestens eine Woche aufrechterhalten werden kann (Vieira Pinheiro *et al.*, 2001).

1.1.3.3 Weitere Modifizierungen der Asparaginase

Neben der Pegylierung der Asparaginase wurden weitere zahlreiche chemische Modifikationen des Enzyms vorgenommen, die aber gewisse Nachteile mit sich brachten und sich somit nicht durchgesetzt haben. Neben Verknüpfungen mit Dextran (Davis *et al.*, 1991), Poly-Alanyl Peptiden (Uren & Ragin, 1979) und humanem Plasmaalbumin (Nerkar & Gangadharan, 1989) wurde versucht, die Asparaginase zu alkylieren (Martins *et al.*, 1990), sie mit Erythrozyten zu verbinden (Naqi *et al.*, 1988; De Loach *et al.*, 1990) oder in Liposomen (Jorge *et al.*, 1994) einzukapseln. Auch die Elimination von immundominanten Epitopen brachte keine erfolgreichen Ergebnisse (Moola *et al.*, 1994).

Im Folgenden findet sich die quaternäre Struktur der *E. coli* Asparaginase mit ihren vier Untereinheiten wieder, die jeweils durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet sind (Abb.1).

1.1.4 Struktur der Asparaginase

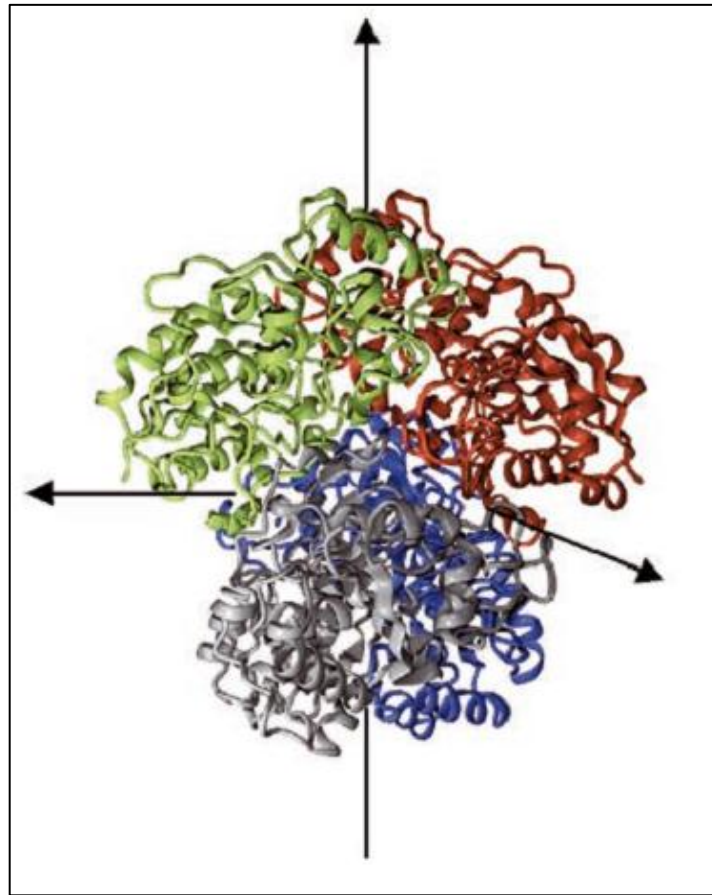
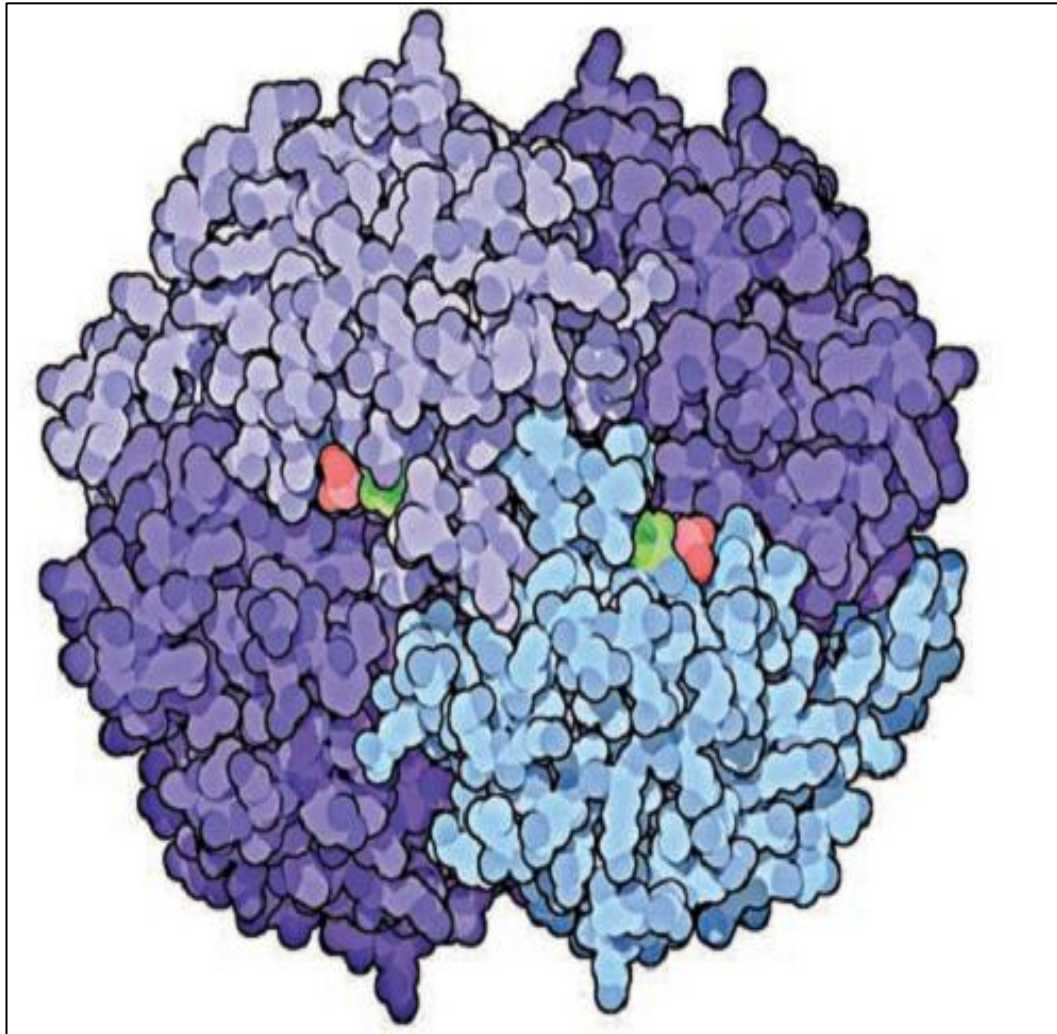


Abbildung 1: Quaternäre Struktur der *E. coli* Asparaginase nach Michalska & Jaskolski, 2006

E. coli Asparaginase ist ein Homotetramer aus 326 Aminosäuren. Alle Asparaginasen bestehen aus vier identischen Untereinheiten (siehe Abbildung 1 und Abbildung 2) mit einem Molekulargewicht von jeweils ca. 30 Kilodalton (kDa), wobei jede ein aktives Zentrum besitzt (Whelan & Wriston, 1969; Swain *et al.*, 1993).

Abbildung 2 auf der nächsten Seite zeigt eine weitere Darstellung der Asparaginase bestehend aus vier identischen Untereinheiten. Die vier aktiven Zentren binden Asparagin durch ein dortiges Threonin (Goodsell, 2005).



rot: Asparagin, grün: Threonin, lila/blau: Untereinheit

Abbildung 2: Molekulare Struktur der Asparaginase nach Goodsell, 2005

Tabelle 1 auf der nächsten Seite fasst vergleichend die wesentlichen chemischen Eigenschaften der *E. coli*-, *Erwinia*- und PEG-Asparaginase zusammen.

	<i>E. coli</i> Asparaginase (nativ)	PEG- Asparaginase (modifiziert)	<i>Erwinia</i> Asparaginase (nativ)
Aktivität (IU/mg Protein)	280 - 400	280 - 400	650 - 700
K_m (μ M) Asparaginase	12	12	12
K_m (μ M) Glutaminase	3000	3000	1400
Molekulargewicht (Daltons)	141000	135000	138000
Isoelektrischer Punkt	5,0	5,0	8,7

IU/mg: international unit pro Milligramm, K_m : Michaelis-Menten Konstante,
 μ M: Mikromolar

**Tabelle 1: Vergleich von modifizierter und nativer Asparaginase nach
 Narta *et al.*, 2007**

Native *E. coli* Asnasen besitzen ein Molekulargewicht von 133 - 141 kDa, *Erwinia* Asnasen liegen bei 138 kDa und PEG-Asnasen bei 145 kDa (Jackson & Handschumacher, 1970; Maita & Matsuda, 1980). Die meisten Asparaginase verfügen zusätzlich über eine Glutaminaseaktivität, die 3 - 9 % der gesamten Asparaginaseaktivität ausmacht (Miller *et al.*, 1969). Asparagin und Glutamin werden in demselben aktiven Zentrum des Enzyms metabolisiert, indem Stickstoffatome sowohl in Amiden als auch in Estern relativ unspezifisch angegriffen werden (Nakamura *et al.*, 1971). Hohe Konzentrationen an Asparaginsäure oder Ammoniak inhibieren nicht die hydrolytische Aktivität. Beide Enzyme weisen eine sehr hohe Aktivität und Stabilität auf (Aghaiypour *et al.*, 2001).

Obwohl der K_m -Wert für Glutamin ca. 250 mal höher als der von Asparagin liegt, kann eine hohe Asparaginase-Aktivität neben der Asparagin-Depletion zusätzlich zu einer Glutamin-Depletion führen. Die Asparagin-Depletion erfolgt binnen Minuten und ist wesentlich schneller als die

Glutamin-Depletion (Miller *et al.*, 1969; Cooney & Handschumacher, 1970; Wriston, 1985). Die Hydrolyse von Glutamin erfolgt nicht durch Kontaminierung der Asnase, sondern durch die Asnase selbst (Ramya *et al.*, 2012).

Die im Meerschweinchenplasma enthaltene Asparaginase hat praktisch keine Glutaminaseaktivität. Wegen der äußerst schwierigen Isolierung des Enzyms aus dem Meerschweinchenplasma konnten aber nie ausreichende Mengen für klinische Studien zur Verfügung gestellt werden (Campbell & Mashburn, 1969).

1.1.5 Pharmakodynamik

1.1.5.1 Wirkmechanismus

Der Wirkungsmechanismus aller Asparaginasepräparationen ist derselbe. Asparaginase hydrolysiert extrazelluläres Asparagin zu Asparaginsäure, unter der Abspaltung von Ammoniak (NH_3), wodurch die Aminosäure Asparagin im Blutplasma verschwindet und das Zellgift Ammoniak (NH_3 ; im Plasmamillieu als NH_4^+) ansteigt (Cooney & Handschumacher, 1970). Eine vergleichbare hydrolytische Katalyse findet sich bei Serinproteasen, allerdings greift dort nicht Threonin, sondern Serin an (Röhm & Van Etten, 1986). Abb. 3 auf der nächsten Seite zeigt schematisch die Wirkungsweise der Asnase.

Tumorzellen, besonders lymphatische Zellen, benötigen eine große Menge an Asparagin, um ihr schnelles malignes Wachstum aufrechtzuerhalten. Als Ressourcen werden dazu u.a. die im Blutserum vorhandenen Mengen an Asparagin verwendet. Durch die Asparaginase wird diese aber limitiert und somit das Tumorwachstum gehemmt.

Kapitel 1.1.5.2 beschreibt die genaue therapeutische Wirkung der Asparaginase als Zytostatikum im Hinblick auf die Tumorthherapie.

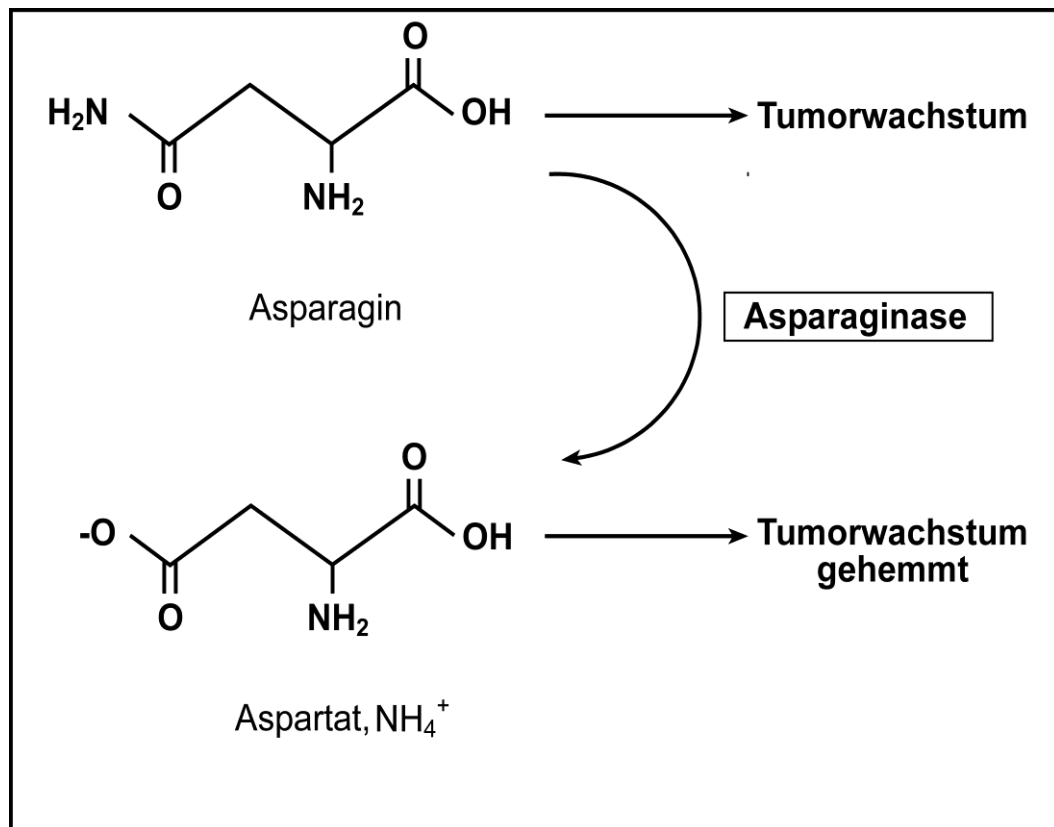


Abbildung 3: Wirkungsweise der Asparaginase modifiziert nach Narta *et al.*, 2007

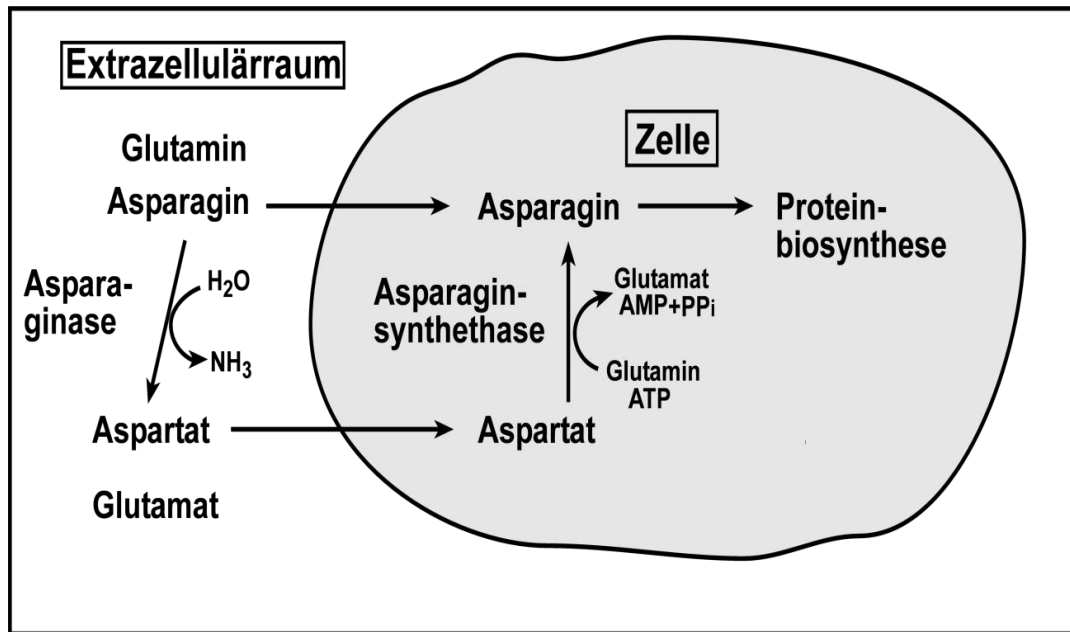
1.1.5.2 Therapeutische Wirkung

Die antineoplastische Wirkung der Asnase wird durch eine drastische Senkung des Asparagin-Spiegels im Plasma vermittelt. Asparagin gilt insbesondere für Blasten der ALL und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) als essentielle Aminosäure, während normale Körperzellen diese Aminosäure selbst synthetisieren können. Deshalb werden sie auch durch den raschen Entzug von Asparagin nicht geschädigt, da sie mit dem Enzym Asparagin-Synthetase Asparagin synthetisieren können (Haley *et al.*, 1961; Miller *et al.*, 1969; Ohnuma *et al.*, 1970).

Leukämische Lymphoblasten und bestimmte andere Tumorzellen verfügen über eine sehr niedrige Konzentration an Asparagin-Synthetase, teilweise fehlt sie ihnen auch. Daher sind die Zellen auf eine extrazelluläre Asparaginzufuhr für ihre Proteinsynthese angewiesen. Sie benötigen große Mengen an Asparagin, um ihr schnelles malignes Wachstum aufrechtzuerhalten (Prager & Bachynsky, 1968; Kiriyaama *et al.*, 1989). Der Abbau der Aminosäure Asparagin durch die Asparaginase resultiert in

einer Inhibition der Desoxyribonukleinsäure-/Ribonukleinsäuresynthese und führt somit anschließend zur Apoptose der Zelle (Piatkowska-Jakubas *et al.*, 2008).

Abb. 4 veranschaulicht den therapeutischen Wirkmechanismus der Asparaginase.



NH_3 : Ammoniak, ATP: Adenosintriphosphat, AMP: Adenosinmonophosphat, PP_i : Diphosphat

Abbildung 4: Therapeutischer Wirkmechanismus der Asparaginase modifiziert nach Müller & Boos, 1998

1.1.5.3 Asparaginasedosierungen für eine optimale therapeutische Wirkung

Ziel der Asparaginasetherapie ist eine komplette Depletion des Asparagins. Es konnte gezeigt werden, dass eine Dosisapplikation von 5000 U/m² Asparaginase medac® an jedem dritten Tag über den gewünschten Zeitraum eine komplette Asparagindepletion in der Mehrzahl der Patienten mit de novo ALL sicherstellt. Eine andauernde Asparaginasedepletion kann durch Asparaginaseaktivitäten von > 100 U/l im Plasma erreicht werden (Pinheiro & Boos, 2004).

Eine Verlängerung der Dauer der Asparaginaseaktivität wird durch wiederholte Gabe von Asnase erreicht. Eine Asparaginaseaktivität < 0,4 international unit pro Milliliter (IU/ml) führte zu einer insuffizienten Desaminierung, währenddessen Konzentrationen von mindestens

0,4 - 0,7 IU/ml für eine optimale Asparagin- und Glutamin-Spaltung benötigt wurden (Avramis & Panosyan, 2005).

Es ist zu beachten, dass die zur effektiven Asparaginasedepletion benötigte Asparaginasekonzentration eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Patienten aufweist. Ebenso variieren die Asparaginasepräparate in ihren Eigenschaften und benötigen im Falle eines Austausches eine Anpassung von Dosis und Therapieplan (Avramis & Panosyan, 2005).

1.1.6 Pharmakokinetik

Asparaginase ist als Protein praktisch oral nicht resorbierbar. Die Pharmakokinetik von jedem Medikament hängt stark von der Applikationsart ab, je nachdem ob es intramuskulär (i.m.), intravenös (i.v.) oder subkutan (s.c.) verabreicht wird (Schwartz, 1970; Eden *et al.*, 1990; Gaynon *et al.*, 2000; Schrappe *et al.*, 2000). Bei i.m. Injektion werden etwa halb so hohe Plasmakonzentrationen wie nach i.v. Gabe erzielt (Schwartz, 1970).

Aufgrund des hohen Molekulargewichts diffundiert Asnase nur schwer aus den Kapillaren, so dass ca. 80 % der aktiven Substanz im intravaskulären Raum bleiben. In der Regel kann das Enzym nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren (Ohnuma *et al.*, 1970). Asnase konnte in größeren Mengen in der Pleuraflüssigkeit und bei Aszites festgestellt werden, aber nicht im Liquor (Park *et al.*, 1981; Riccardi *et al.*, 1981).

Verschiedene Arbeiten zeigen einen Asparaginschwund im Liquor bei anhaltender Asparaginasetherapie, möglicherweise aufgrund von Diffusion von Liquor-Asparagin ins Plasma. Es wird berichtet, dass auch die meningeale Leukämie erfolgreich mit Asparaginase behandelt wurde (Riccardi *et al.*, 1981; Dibenedetto *et al.*, 1995).

Asnasen bei Patienten, die im Verlauf der nativen Asnasetherapie Hypersensitivitätsreaktionen entwickelten, weisen eine deutlich verkürzte Halbwertszeit auf (Haskell *et al.*, 1969; Capizzi *et al.*, 1971; Leventhal & Henderson, 1971). Tabelle 2 gibt eine Übersicht der drei verschiedenen Asparaginasepräparationen mit ihren Halbwertszeiten.

Asparaginasepräparation	Halbwertszeit (Tage \pm 1 SD)
<i>E. coli</i> Asparaginase	1,28 \pm 0,35
<i>Erwinia</i> Asparaginase	0,65 \pm 0,13
PEG- Asparaginase	5,73 \pm 3,24

SD: Standardabweichung

Tabelle 2: Halbwertszeiten unterschiedlicher Asparaginasepräparationen nach Narta *et al.*, 2007

Asselin untersuchte die Halbwertszeiten von den drei verschiedenen Asparaginase-Präparationen bei Patienten mit ALL: Asparaginase aus *E. coli*, Asparaginase aus *Erwinia chrysanthemi* (*Erwinia*-Asnase) und PEG-Asparaginase (Oncaspar®). Die zuerst genannten Asparaginasen wurden in einer Dosierung von 25.000 U/m² intramuskulär eingesetzt. Letztere mit einer Dosis von 2500 U/m². Im Gegensatz zur nativen Asnase war die Aktivität von Oncaspar® (> 0,01 IU/ml) über den gesamten Beobachtungszeitraum von 26 Tagen messbar. Spitzenwerte der Enzymaktivität wurden zwischen 72 und 96 Stunden nach Applikation bestimmt (Asselin, 1999).

Zahlreiche Studien belegen, dass die Pharmakokinetik immer eine individuelle hohe Patientenvariabilität besitzt (Asselin *et al.*, 1993a; Müller *et al.*, 2001), wodurch es sich üblicherweise im Voraus als sehr schwierig erweist, Aussagen über die zu erreichende Enzymaktivität während der Behandlung zu machen (Pinheiro & Boos, 2004).

Zu berücksichtigen ist, dass die Asnase-Therapie mit erhöhten Blut-Ammoniakwerten durch die Umwandlung von Asparagin in Asparaginsäure verbunden ist. Asparaginase wird im retikuloendothelialen System zu Peptiden und Aminosäuren abgebaut (Hall, 1970; Ohnuma *et al.*, 1970; Brueck *et al.*, 1989).

1.1.7 Therapeutische Bedeutung der Asparaginase

Bei der Untersuchung der Wirksamkeit des Enzyms gegenüber Krebspatienten stellte sich heraus, dass nur ein Tumor kontinuierlich auf die Asnase ansprach, nämlich die ALL. Andere Tumoren sprachen recht

unkontinuierlich an, darunter die akute myeloische Leukämie (AML) (Clarkson *et al.*, 1970; Pratt *et al.*, 1970; Ortega *et al.*, 1977), NHL (Desai *et al.*, 1997) und chronische Leukämien (Narta *et al.*, 2007).

Die meisten anfälligen Tumoren waren lymphoiden Ursprungs, während die meisten soliden Tumoren resistent gegenüber dem Enzym reagierten (Clarkson *et al.*, 1970; Tallal *et al.*, 1970; Crowther, 1971).

Oettgen *et al.* waren die ersten, die die Wirksamkeit der Asnase in der Therapie der Leukämie bei Menschen bewiesen. Das Enzym kam erstmalig 1967 bei akuter lymphatischer Leukämie zum klinischen Einsatz (Oettgen, *et al.*, 1967). Asparaginase kann sowohl in der Mono- als auch im Rahmen einer Polychemotherapie eingesetzt werden. Oncaspar® ist in Deutschland bei Patienten mit bekannter Überempfindlichkeit auf „native“ Asnase angezeigt (medac GmbH, 2007).

Asparaginase ist zu einem essentiellen Bestandteil in fast allen pädiatrischen ALL-Behandlungsprotokollen geworden (Iwamoto *et al.*, 2007). Studien aus den ersten Jahren des klinischen Einsatzes bestätigen den hohen Stellenwert der Asparaginase als antineoplastisches Mittel, sowohl was das krankheitsfreie Intervall als auch das Gesamtüberleben betrifft (Desai *et al.*, 1997). Es ist belegt worden, dass sich das leukämiefreie Überleben (event free survival) bei ALL Patienten durch die Therapie deutlich verbessert (Desai *et al.*, 1989; Müller & Boos, 1998), auch bei Hochrisiko-Patienten der T-Zell-Linie (Amylon *et al.*, 1999).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich der Gebrauch der Asnase in den letzten Jahren in der Behandlung der Leukämie und anderen lymphoproliferativen Erkrankungen stark ausgeweitet hat (Ohnuma, *et al.*, 1970; Jones *et al.*, 1977). Das Zytostatikum ist als Bestandteil der antineoplastischen Kombinationstherapie der ALL im Kindes- und Erwachsenenalter, sowie bei Non Hodgkin-Lymphomen im Kindesalter angezeigt und als fester Bestandteil von Studienprotokollen im Rahmen einer Kombinationstherapie mit anderen Zytostatika nicht mehr wegzudenken (Iwamoto *et al.*, 2007).

Früher war der Einsatz des Zytostatikums auf die Remissionsinduktionstherapie der ALL fokussiert (Haskell *et al.*, 1969; Ohnuma *et al.*, 1970; Jones *et al.*, 1977). Heutige Studien veranschaulichen jedoch zusätzlich

den Gebrauch von Asnase über einen Zeitraum von 20 - 30 Wochen in der Konsolidationstherapie (Amylon *et al.*, 1999).

Aktuelle Studien bestätigen auch heute noch immer die überragende Bedeutung der Asparaginase in der Kombinationschemotherapie gegen die ALL und gegen bestimmte Subtypen des NHL (Müller & Boos, 1998).

1.1.8 Nebenwirkungen

Der Wirkmechanismus der Asparaginase unterscheidet sich fundamental von dem anderer Zytostatika. Im Gegensatz zu anderen Chemotherapeutika aus den Behandlungsprotokollen hat die Asnase nur eine geringe Knochenmarksdepression zur Folge und beeinträchtigt nicht die gastrointestinale/orale Mukosa oder Haarfollikel in ihrem Wachstum (Pinheiro & Boos, 2004).

Das Enzym besitzt trotzdem ein ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil. Thrombosen zählen zu den Hauptnebenwirkungen der Asparaginase, außerdem wird über Hepatotoxizität, Pankreatitis, Hyperglykämie, Störungen des zentralen Nervensystems und Hypersensitivitätsreaktionen berichtet (Lanvers-Kaminsky, 2006).

Immunologische Reaktionen gehören zu den am meisten auftretenden Problemen während der Behandlung (Narta *et al.*, 2007). Klinische Hypersensitivität tritt am häufigsten auf, wenn Asnase in Abwesenheit von Kortikosteroiden verabreicht wird. Bei gleichzeitiger Gabe von Kortikosteroiden wiesen die Patienten eine geringere Inzidenz von Antikörpern auf (Avramis & Panosyan, 2005).

Neben immunologischen Reaktionen (Müller *et al.*, 2001) kann eine Asparaginase-Therapie auch zu Störungen in den Organsystemen führen, die eine hohe Proteinsyntheseleistung aufweisen (insbesondere Leber und Pankreas) (Mitchell *et al.*, 1994b; Nowak-Göttl *et al.*, 1996).

Alle kommerziell erhältlichen Asparaginasepräparate weisen ein ähnliches Nebenwirkungsprofil auf. Im Falle der PEG-Asnase beobachtet man eine gewisse Suppression der allergischen Reaktionen (Kamisaki *et al.*, 1981). Da die Asparaginase meistens in einer Kombinationstherapie zum Einsatz kommt, ist die Abgrenzung von Nebenwirkungen anderer Medikamente oft schwierig (Nowak-Göttl *et al.*, 2003). Die Anzahl der klinisch relevant

lebensbedrohlich betroffenen Patienten ist sehr gering und hat sich durch die Modifikation der nativen Asnase nochmals verbessert (Holcenberg, 1977).

1.1.8.1 Auswirkungen auf das Immunsystem

Asparaginase ist ein körperfremdes, immunogenes Protein. Die klinische Erfahrung hat gezeigt, dass die Gabe der Asnase zur Bildung spezifischer Antikörper gegen das Enzym führt (Avramis *et al.*, 2002).

Diese Antikörper resultieren einerseits in Hypersensitivitätsreaktionen (Killander *et al.*, 1976), andererseits sind sie aber auch in der Lage die Asparaginase zu inaktivieren (Asselin, 1999). In Anlehnung an zahlreiche Studien liegt die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer frühen Hypersensitivitätsreaktion bei ungefähr 5 - 33 % aller behandelten Patienten (Evans *et al.*, 1982). Trotz der recht hohen Inzidenz von anaphylaktischen Reaktionen ist die Anzahl fataler tödlicher Ausgänge gering (Zubrod, 1970).

Killander *et al.* verglichen 57 Kinder und Erwachsene. Dabei stellte sich heraus, dass sich während der Therapie bei Erwachsenen weitaus häufiger Hypersensitivitätsreaktionen und spezifische Antikörper gebildet hatten (Killander *et al.*, 1976).

Die am häufigsten auftretende klinische Manifestation einer Hypersensitivitätsreaktion ist Urtikaria. Diese kann manchmal mit Antihistaminika behandelt werden, schwerwiegende Reaktionen erfordern jedoch andere Maßnahmen (Haskell *et al.*, 1969; Ohnuma *et al.*, 1970).

Das Spektrum an allergischen Reaktionen reicht vom lokalisierten Erythem bis zur systemischen Anaphylaxie und Bronchospasmus. Es wurden fatale Anaphylaxien, auftretend bis zu vier Stunden nach Injektion beschrieben. Andere Hypersensitivitätsreaktionen wie Schmerz an der Injektionsstelle, Indurationen, Ödeme, Schwellungen, Fieber und Hautausschläge sind möglich (Haskell *et al.*, 1969).

Risikofaktoren für Hypersensitivitätsreaktionen sind eine tägliche Dosis > 6000 international unit pro Quadratmeter (IU/m²) (Jaffe *et al.*, 1971), i.v. Applikation im Gegensatz zu i.m. (Nesbit *et al.*, 1979), Anzahl der verabreichten Dosen (Trueworthy *et al.*, 1978), wiederholte Asnasegabe

nach therapiefreiem Intervall (Dellinger & Miale, 1976) und die Monotherapie im Gegensatz zur Kombinationstherapie (Oettgen, *et al.*, 1970).

In seltenen Fällen können allergische Reaktionen bereits bei der ersten Asparaginase-Applikation auftreten. Es darf nicht vergessen werden, dass die zusätzlich begleitend verwendeten Chemotherapeutika wie 6-Mercaptopurin oder Vincristin ebenfalls Hypersensitivitätsreaktionen verursachen können. Im Vergleich zur nativen Asnase, treten bei der PEG-Asnase nur 10 % an Hypersensitivitätsreaktionen auf (Dellinger & Miale, 1976; Amylon *et al.*, 1999).

Die klinische Erfahrung zeigt, dass nur 20 - 25 % der Patienten nach Umstellung auf eine andere Asnase erneut Hypersensitivitätsreaktionen entwickeln. Die Umstellung steht bisher in keiner Verbindung mit einem schlechteren Therapieergebnis (Avramis & Panosyan, 2005).

Eine vorhergehende intrakutane Testung schließt anaphylaktische Reaktionen nicht aus (Clarkson *et al.*, 1970; Evans *et al.*, 1982).

1.1.8.2 Auswirkungen auf das Knochenmark

Therapeutisch verabreichte Asnase hat sowohl immunogenes als auch immunsuppressives Potenzial. Neben den Auswirkungen auf die leukämischen Blasten kann das Enzym auch eine milde Myelosuppression hervorrufen, wobei alle drei Blut-Zell-Linien betroffen sein können. Dies kann zu einem Anstieg an Infektionen während der Therapie führen (Johnston *et al.*, 1974).

1.1.8.3 Auswirkungen auf die Hämostase

Durch die Beeinträchtigung der Proteinsynthese/Proteinfunktion kommt es häufig zu Gerinnungsstörungen (Piatkowska-Jakubas *et al.*, 2008), die sich sowohl als Blutungen als auch als disseminierte intravaskuläre Thrombosen äußern können (Ott *et al.*, 1988; Nowak-Göttl *et al.*, 1997), wobei das Thromboserisiko im Vordergrund zu stehen scheint (Müller & Boos, 1998). Die gemeldeten Inzidenzen von Thrombosen variieren von 1 - 36 %, was u.a. vom verwendeten Chemotherapieprotokoll abhängt (Mitchell *et al.*, 1994; Payne & Vora, 2007). Es wird hauptsächlich über

venöse Thrombosen berichtet, arterielle Thrombosen treten seltener auf (Payne & Vora, 2007).

Eine Monotherapie führt im Vergleich zur Kombinationstherapie mit Kortikosteroiden zu schwerwiegenderen Blutgerinnungsproteinabfällen (Mitchell *et al.*, 1994). Neben der Asparaginase können auch die gleichzeitige Therapie mit anderen myelosuppressiven Medikamenten bzw. die Grunderkrankung selbst für diese Nebenwirkungen verantwortlich sein (Mauz-Korholz *et al.*, 2000).

Störungen der Blutgerinnung und Fibrinolyse treten durch Abfall des Fibrinogens (Hunault-Berge *et al.*, 2008; Piatkowska-Jakubas *et al.*, 2008), des Antithrombins 3 (AT3) (Anderson *et al.*, 1979), des Proteins C/S (Homans, 1987) oder des Plasminogens auf (Priest *et al.*, 1982). Eine Thrombozytopenie erhöht das Blutungsrisiko (Sutor *et al.*, 1992; Mitchell *et al.*, 1994a).

Verschiedene Studien berichten über Blutungs- (Oettgen *et al.*, 1970) und Thrombosekomplikationen (Nowak-Göttl *et al.*, 1994; Nowak-Göttl *et al.*, 1996b). Etwa die Hälfte aller schweren Blutungen und Thrombosen betreffen zerebrale Gefäße (Sutor *et al.*, 1992) und können zu Apoplex, Krampfanfällen, Kopfschmerzen oder Bewusstlosigkeit führen (Gugliotta *et al.*, 1992).

Ein erhöhtes Thromboserisiko haben Kinder unter nativer Asparaginastherapie, die Faktor V-Mutationen, aktivierte Protein C-Resistenzen bzw. verminderte Plasmaspiegel an Protein C/S oder AT3 aufweisen (Nowak-Göttl *et al.*, 1995b).

Elliot *et al.* berichteten über thrombembolische Komplikationen während der Induktionstherapie der ALL bei Erwachsenen (Elliott *et al.*, 2004). Eine regelmäßige Kontrolle des Blutgerinnungsprofils ist erforderlich.

Mattioli-Belmonte *et al.* korrigierten niedrige AT3-Spiegel durch eine i.v. Infusion. Dabei wurde ein ausreichend hoher konstanter AT3-Spiegel während der gesamten Therapie aufrechterhalten (Mattioli Belmonte *et al.*, 1991).

In anderen Studien wird der Gebrauch von Fresh Frozen Plasma als nicht adäquate Methode für fallende AT3-Spiegel angesehen. Eine prophylaktische Gabe von niedermolekularen Heparinen zur Thrombose-

prophylaxe wird angeraten (Meister *et al.*, 2008; Piatkowska-Jakubas *et al.*, 2008).

1.2 Die Hämostase

Die Hämostase als das System des Auf- und Abbaus von Thromben besteht im Wesentlichen aus den Komponenten Plasma und Blutzellen. Im Detail beinhaltet das hämostatische System Thrombozyten, neutrophile Granulozyten, die stationäre Gefäßwand, die Blutströmung und Faktoren der Gerinnung und der Fibrinolyse (Spronk *et al.*, 2003). Diese einzelnen Bestandteile regulieren sich gegenseitig durch Aktivierung oder Inhibition (Gentry, 2004). Für den menschlichen Organismus ist ein funktionierendes Blutgerinnungssystem lebenswichtig. Neben der Blutstillung bei Verletzungen zur Minimierung des Blutverlustes ist die Erhaltung des Gleichgewichts aus Gerinnung und gerinnungshemmenden Faktoren von zentraler Bedeutung (Baker & Brassard, 2010). Eine normale Hämostase vollbringt zwei Hauptfunktionen: Erstens hält es das Blut in einem flüssigen, gerinnselfreien Status (Tanaka *et al.*, 2009) und zweitens induziert es - falls nötig - die schnelle Bildung eines lokalisierten, blutstillenden Pfropfens an der Stelle einer vaskulären Läsion (Kumar *et al.*, 2005).

Schon minimale Störungen des Systems können zu Thrombosen bzw. zu einer erhöhten Blutungsneigung mit inneren Blutungen führen (Levi *et al.*, 1999). Abb. 5 demonstriert die dynamischen Prozesse der Hämostase in einer sehr vereinfachten anschaulichen Weise. Je nach Hämostase-Status können sich Mikrothromben oder Blutungen bilden.

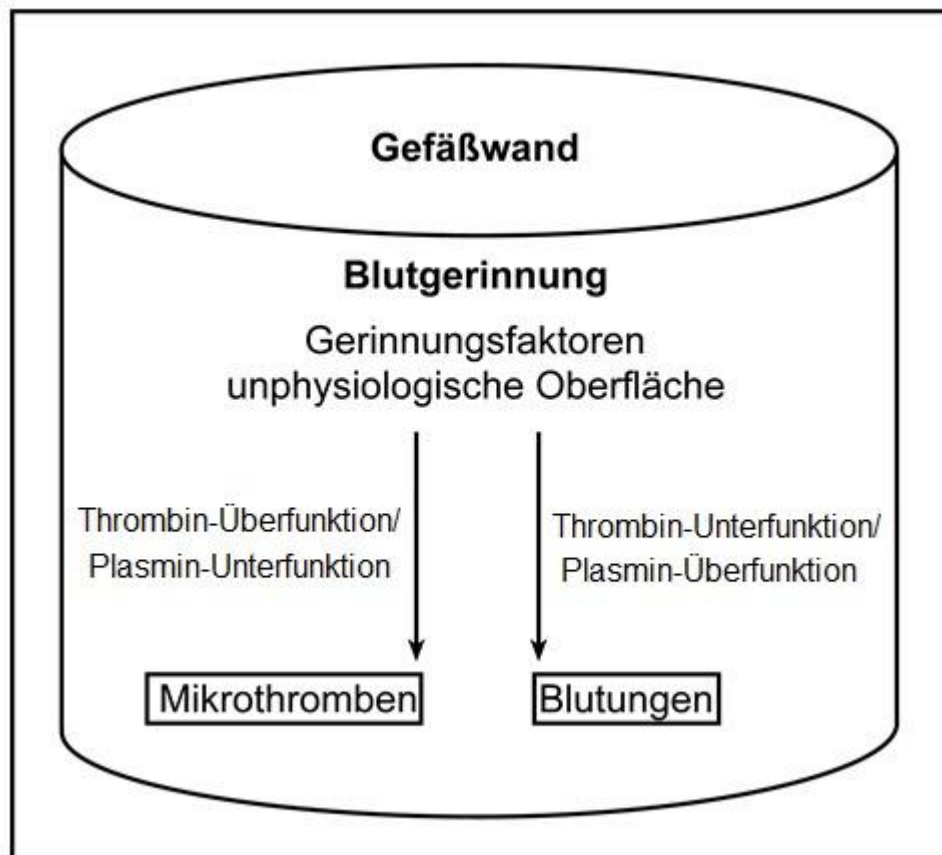


Abbildung 5: Dynamik der Blutgerinnung modifiziert nach Spronk *et al.*, 2003

1.2.1 Gliederung der Hämostase

1.2.1.1 Primäre Hämostase

Unter diesem Begriff verbirgt sich die Bildung eines Thrombozytenpfropfes, welcher relativ kurzfristig nach der Verletzung eintritt. Die Thrombozyten unterziehen sich dabei einer Reihe von verschiedenen Reaktionen. Sie adhären an der Gefäßwand, aggregieren, bilden Pseudopodien, verändern ihre Form und setzen nach ihrer Aktivierung vasokonstriktorische Stoffe (Adrenalin, Noradrenalin und Serotonin) frei. Dabei kommt den Thrombozyten eine Schlüsselfunktion bei der Blutgerinnung zu (George, 2000).

Es folgt die Aktivierung der Gerinnungskaskade über Kontakt der Gerinnungsfaktoren mit Kollagen des Subendothels (endogene Aktivierung) und oder durch in das Blut abgegebene Aktivatoren (exogene Aktivierung) (Monroe *et al.*, 2002).

1.2.1.2 Sekundäre Hämostase

Unter der sekundären Hämostase versteht man die plasmatische Blutgerinnung, die sich in ein intrinsisches und ein extrinsisches System aufteilen lässt (s.u.). Beide führen zur Aktivierung des Faktors 10 (F10), der im Komplex mit seinem Cofaktor 5a, Calcium-Ionen (Ca^{2+}) und Phospholipiden zur Thrombin-Generierung führt (Osterud & Rapaport, 1977).

Extrinsisches System

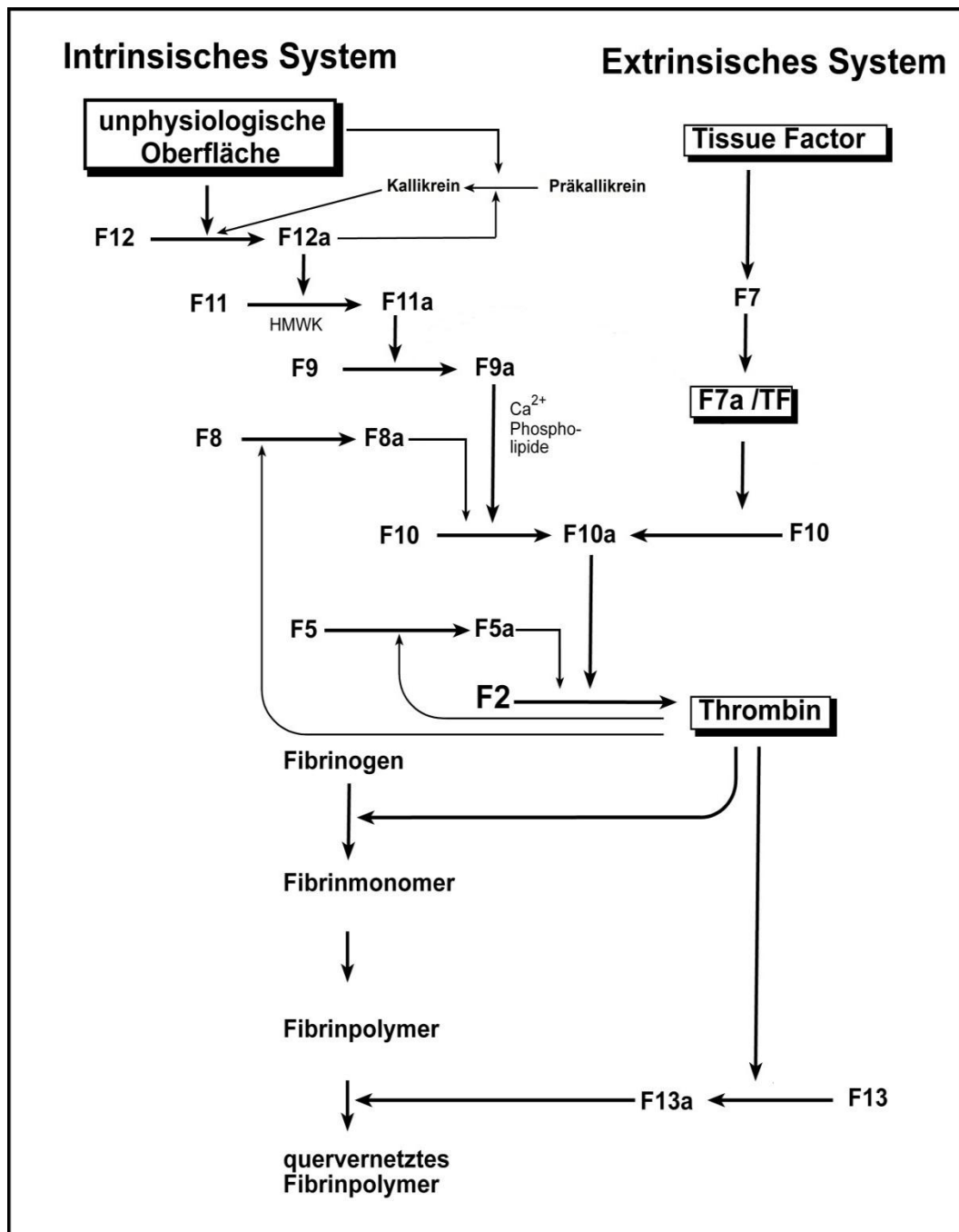
Die Aktivierung beginnt mit der Freisetzung von Gewebsthromboplastin (tissue factor = TF). TF aktiviert Faktor 7 (F7), was dann in Ca^{2+} -Anwesenheit innerhalb Sekunden bis Minuten zur Aktivierung von F10 und schließlich zur Aktivierung von Faktor 2 (Prothrombin → Thrombin) führen kann (Rosing *et al.*, 1985).

Intrinsisches System

Die Aktivierung beginnt durch Kontakt von Faktor 12 (F12) mit einer unphysiologischen Oberfläche. Kallikrein (K) verstärkt diesen Aktivierungsweg. Nach mehreren Minuten kann in Anwesenheit von Ca^{2+} Prothrombin in Thrombin umgewandelt werden (Walsh, 2001).

Nach neuem Nomenklaturvorschlag werden die Gerinnungsfaktoren vorzugsweise arabisch nummeriert (Page, 2009). Alle hier dargestellten Abbildungen zum Gerinnungssystem richten sich danach.

Abb. 6 gibt eine schematische Darstellung der endogenen und exogenen Gerinnungskaskade wieder.



HMWK: high molecular weight kinogen, TF: tissue factor, F: Faktor,
Ca²⁺: Calcium-Ionen

Abbildung 6: Schematische Darstellung der endogenen und exogenen Gerinnungskaskade modifiziert nach Arbogast, 2004

Die Komponenten des extrinsischen Systems werden üblicherweise klinisch in der Prothrombinzeit (PT) gemessen, wohingegen die des intrinsischen Systems mit der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit gemessen werden (aPTT).

1.2.1.3 Tertiäre Hämostase

Die tertiäre Hämostase ist die Fibrinolyse mit ihrem Zentralenzym Plasmin. Die Fibrinolyse läuft binnen Stunden ab und kann in einen plasmatischen und einen zellulären (aktivierte neutrophile Granulozyten) Teil gegliedert werden (Medved & Nieuwenhuizen, 2003; Nesheim *et al.*, 2003).

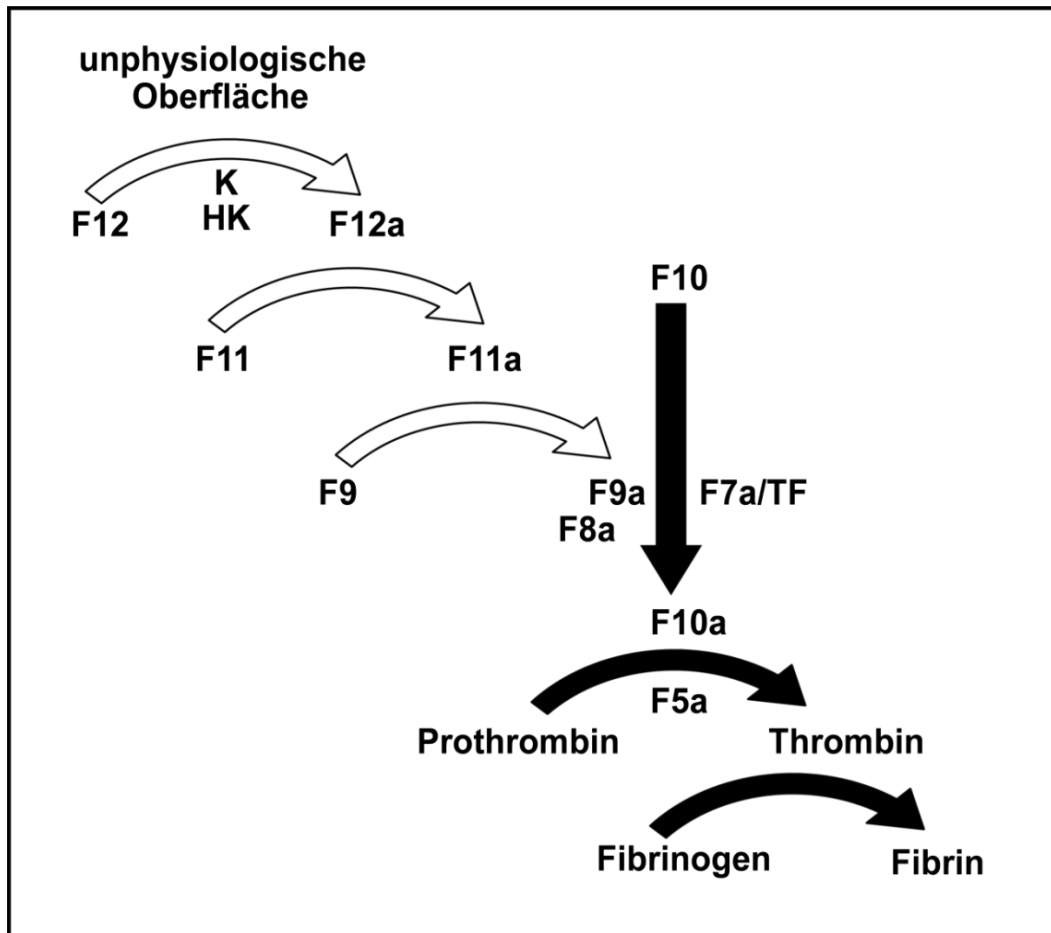
1.2.2 Die intrinsische Blutgerinnungskaskade

Gegenstand der vorliegenden Dissertation ist der Einfluss von bakterieller Asnase auf das intrinsische Gerinnungssystem des Menschen. Daher konzentriert sich der folgende Teil der Einführung auf das intrinsische System, das extrinsische System wird nicht weiter berücksichtigt (Kaplan, 1996).

Das intrinsische System wird typischerweise als eine Abfolge von proteolytischen Reaktionen beschrieben, die schließlich Faktor 9 (F9) aktivieren. Wenn Blut in Berührung mit unphysiologischen Oberflächen (z. B. negativ geladenen Oberflächen) kommt, werden eine Serie von proteolytischen Reaktionen initiiert, die Faktor 12 (F12), Präkallikrein (PK) und Faktor 11 (F11) aktivieren und hochmolekulares Kininogen (HK) spalten (Cochrane & Griffin, 1982; Kaplan & Silverberg, 1987).

Diese Prozesse werden auch Kontaktaktivierung genannt. Die intrinsische Hämostase ist für verschiedene plasmatische Abwehrmechanismen einschließlich der Fibrininformation, Komplementaktivierung, Fibrinolyse und Kiningenerierung von großer Bedeutung (Chu, 2010).

Abb. 7 auf der nächsten Seite stellt das intrinsische System als Abfolge proteolytischer Reaktionen dar.



K: Kallikrein, HK: hochmolekulares Kininogen, TF: tissue factor, F: Faktor

**Abbildung 7: Das intrinsische System als Abfolge proteolytischer Reaktionen
modifiziert nach Gailani, 2007**

Der Beginn des intrinsischen Systems ist die Aktivierung des F12/PK. Beide erweisen sich als äußerst oberflächensensible Faktoren (Kaplan *et al.*, 1986).

Der Kontakt von F12 mit solchen unphysiologischen Oberflächen faltet F12 zu aktiviertem Faktor 12 (F12a). F12a kann allerdings auch durch Kallikrein, gebildet aus seiner Vorstufe PK, generiert werden (Kaplan *et al.*, 1986).

F12 fördert seine eigene Aktivierung, indem F12a PK zu K aktiviert. Dieses aktiviert zusammen mit HMWK (high molecular weight kininogen) als Cofaktor die Überführung des inaktiven F12 in seine aktive Form F12a (siehe Abb. 6).

Sowohl F12 als auch PK können in vivo als auch in vitro durch andere Stoffe aktiviert werden. Plasmin, Trypsin, Glykosaminoglykane, Sulfatide

und Endotoxine, Kollagene, Gelenkknorpel, Cholesterolsulfate und saure Phospholipide stellen in vivo Aktivatoren dar (Gailani & Broze 1993a). Im Gegensatz dazu finden sich Glas, Celit, Ellagsäure und Kaolin unter den in vitro Aktivatoren. Auch Polyphosphate können die Kontaktaktivierung im Plasma induzieren (Smith *et al.*, 2006).

Oberflächenunabhängige Mechanismen für die F12-Aktivierung scheinen wahrscheinlich ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen. Mikrobielle Enzyme können F12 durch Proteolyse direkt angreifen (Kaminishi *et al.*, 1994).

Des Weiteren erleichtern endotheliale Proteine die Präkallikrein-Aktivierung in einer F12 unabhängigen Weise (Joseph *et al.*, 2002).

F12a aktiviert in Anwesenheit von HMWK Faktor 11 zu aktiviertem Faktor 11 (F11a). Dieser könnte auch durch andere Faktoren als den aktivierten Faktor 12a aktiviert werden, was eine Erklärung für die Abwesenheit von Blutungskomplikationen bei einem F12-Mangel darlegt (Kaplan & Ghebrehiwet, 2010). Thrombin kann ebenfalls F11 in seine aktivierte Form F11a überführen (Naito & Fujikawa 1991) (siehe Abb. 6). Es wird postuliert, dass früh generiertes Thrombin während der Thrombusformation F11 aktiviert. Somit wird eine Feedback-Schleife gebildet, die den Gerinnungsablauf verstärkt (Von dem Borne *et al.*, 1995). In vitro aktiviert Thrombin F11 auf der Oberfläche von Plättchen (Baglia & Walsh, 1998). Das Enzym stellt einen deutlich potenteren F11-Aktivator als aktivierter F12 dar (Gailani & Broze, 1991).

F11a aktiviert in Gegenwart von Calcium-Ionen Faktor 9 zu aktiviertem Faktor 9 (F9a) (Gailani, 2000). Beide Proteasen sind in wichtige Bewegungsabläufe involviert, die die Thrombin-Generierung aufrechterhalten/stärken, was die Thrombusformation und Resistenz gegenüber dem fibrinolytischen Abbau stark beeinflusst (Von dem Borne *et al.*, 1995). F9a aktiviert Faktor 10 zu aktiviertem Faktor 10 (F10a). Dabei bilden die Faktoren 9a und aktivierter Faktor 8 (F8a) zusammen mit Phospholipiden und Calcium-Ionen einen Komplex, der als „intrinsische Tenase“ bezeichnet wird. Dieser fördert die Katalyse des F10 zu seiner aktivierten Form F10a. Als Aktivator des F10 ist der Faktor 9a 10^5 bis 10^6 mal stärker wirksam im Komplex mit F8a als alleine. F8a verfügt jedoch selbst über

keine Enzymaktivität, sondern stellt einen Cofaktor dar, der die Reaktionsumsetzung stark beschleunigt (Krishnaswamy, 1992).

F10 stellt das erste Protein der gemeinsamen Strecke der Gerinnungskaskade dar. Seine Aktivierung erfolgt sowohl durch das extrinsische als auch durch das intrinsische System. Die Generierung von Thrombin erfordert die Formation des Prothrombinasekomplexes, der sich aus verschiedenen Elementen zusammensetzt (Tracy *et al.*, 1985).

Mit Hilfe des aktivierten Faktor 5 (F5a), Phospholipiden, Ca^{2+} und aktiviertem F10 wird dieser Komplex auf prokoagulatorischen Oberflächen (z.B. aktivierte Blutplättchen) gebildet, der die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin katalysiert (Morrissey, 2010). Faktor 5a fungiert dabei als Cofaktor, besitzt keine enzymatische Aktivität, beschleunigt die Reaktion jedoch um das 100.000 fache. Als Aktivator des F10 ist der Faktor 9a im Komplex mit F8a effektiver als der extrinsische Komplex, bestehend aus F7a / TF (Ahmad *et al.*, 1992).

Der Prothrombinasekomplex (F10a/5a) ist in der Katalysierung der Prothrombinaktivität 300.000 mal wirksamer als F10a alleine. Aktivierter F10a spaltet nachfolgend Prothrombin (F2) in Thrombin (F2a) und das Prothrombinfragment F1+2 (Nesheim *et al.*, 1979).

Die ersten gebildeten Thrombin-Moleküle initiieren zu Beginn einige Feedbackreaktionen, die ihre eigene Bildung verstärken und somit das schnelle Wachstum des Thrombus an der verletzten Gefäßstelle erleichtern. Die Aktivierung von Faktor 5 (F5) und F8 stellen solche positiven Feedbackmechanismen dar (siehe Abb. 6).

Thrombin spaltet zunächst je zwei Peptide Fibrinopeptid A und B aus Fibrinogen, wobei Fibrinmonomere entstehen, die sich zu Fibrinpolymeren zusammenlagern. Die entstandenen Fibrinmonomere polymerisieren zu einem sichtbaren Fibringerinnsel. Diese werden durch den von Thrombin aktivierten Faktor 13 (F13) in unlösliche stabile Fibrinpolymere verwandelt. In seiner aktivierten Form verknüpft F13 nämlich die Gamma-Seitenketten von Fibrin kovalent miteinander (Bick & Murano, 1994).

Ein Mangel an F12 oder PK weist keine klinische Blutungstendenz auf, was bedeuten könnte, dass sich beide Faktoren gegenseitig ersetzen können (Hoffman & Monroe, 2001). In großen Fall-Kontroll-Studien wurde

eine Korrelation zwischen den Plasmaspiegeln der Faktoren 8, 9, 11 und dem Risiko für venöse Thrombosen demonstriert (Van Hylckama Vlieg *et al.*, 2000).

Studienergebnisse unterstreichen die Vermutung, dass erhöhte F8-Spiegel einen moderaten Risikofaktor für venöse Thrombosen darstellen (Martinelli, 2005).

Abschließend ist zu erwähnen, dass das extrinsische und das intrinsische System nicht streng voneinander zu trennen sind, da es gewisse Interaktionen zwischen beiden Systemen geben könnte (Butenas *et al.*, 2000; Davie, 2003; Arbogast, 2004).

1.2.3 Thrombin

Thrombin (Faktor 2a) ist das zentrale Schlüsselenzym der menschlichen Hämostase. Die Generierung von plasmatischem Thrombin ist in der Hämostase-Regulation von großer Bedeutung. Sowohl seine Generierung als auch seine Inaktivierung sind von höchster klinischer Relevanz (Arbogast, 2004).

Thrombins Beitrag zur Entwicklung von venösen Thrombosen ist durch zahlreiche klinische Studien erwiesen worden, die die Effektivität von direkten/indirekten Thrombininhibitoren in der primären und sekundären Prophylaxe von venösen thromboembolischen Ereignissen belegen (Heit, 2003).

Leider ist der Fortschritt, den die Entwicklung an Methoden zur Diagnosestellung und Prophylaxe von Mikrothromben/Thromben betrifft, bisher unzureichend gewesen (Arbogast, 2004).

Die üblichen alltäglichen klinischen Methoden zur Abschätzung eines hämorrhagischen oder thrombotischen Risikos stellen vor allem die Prothrombinzeit und die aktivierte partielle Thromboplastinzeit dar. Beide Methoden sind viel zu grob, um feine Abänderungen der intrinsischen Hämostase, wie bei Asparaginase zu erwarten, zu detektieren (Mousa, 2010).

Arbeiten aus dem letzten Jahrzehnt messen zwar plasmatische Thrombin-Generierung, z.B. wurden u.a. verschiedene Fluoreszenz-Tests zur Messung des Thrombins entwickelt. Allerdings haben sich diese im

klinischen Alltag nicht durchsetzen können, da sie zu unspezifisch gewesen sind, d.h. sie wurden von plasmatischer Kallikreinaktivität oder von Antithrombin 1 = Fibrin massiv gestört (Van Veen *et al.*, 2008).

1.2.3.1 Bildung und Vorkommen von Prothrombin/Thrombin

Das Vorenzym (Faktor 2) wird in der Leber gebildet, von dort aus es kontinuierlich ins Blut abgegeben wird. Freies Thrombin (F2a) lässt sich nur in sehr geringen Plasma-Aktivitäten (ca. 5,5 milli international unit pro Milliliter [mIU/ml]) systemisch im zirkulierenden Blut nachweisen (Stief, 2006a). Aufbauend auf den innovativen Nachweis von Thrombin im Plasma in Anwesenheit von supramolaren Konzentrationen von Arginin konnten völlig neue Gerinnungsteste etabliert werden, die nicht von Kallikrein oder Antithrombin 1 gestört werden. Der empfindlichste Test für die plasmatische Gerinnung ist der RECA (recalcified coagulation activity assay) (Stief, 2009).

1.2.3.2 Wirkung von Thrombin

Thrombin ist eine biologisch enorm vielseitige Gerinnungsprotease (Davie & Kulman, 2006, Stief, 2012a). Das Enzym wirkt bereits in sehr geringer Konzentration thrombogen. Seine Wirkung stützt sich zum einen auf die proteolytische Aktivierung von im Blutplasma gelösten Proteinen (z.B. Gerinnungsfaktoren). Auf der anderen Seite hat es auch eine Signalwirkung auf die vaskulären Zellen (Lawson *et al.*, 1994).

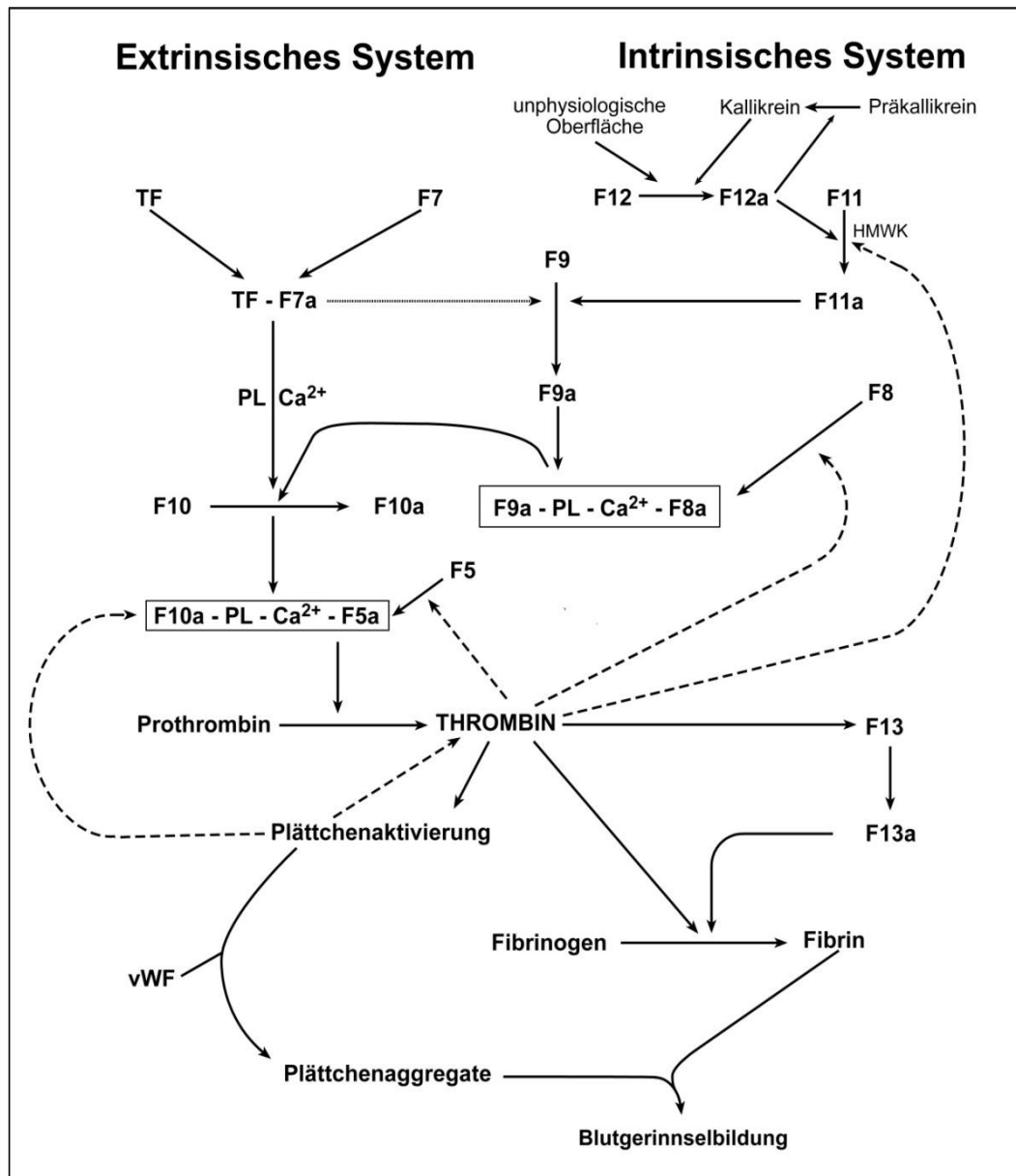
Thrombin ist eine Serinprotease und spaltet Fibrinogen zu Fibrin (Moser, 2008). Weitere prokoagulante Eigenschaften von Thrombin sind die Aktivierung der Faktoren 5, 8, 11 und 13 (Gailani & Broze, 1993b; Von dem Borne *et al.*, 1995). Die aktivierten Faktoren 5 und 8 sind die Hauptkatalysatoren der Blutgerinnung (Arbogast, 2004).

Diese autokatalytischen Aktivierungsprozesse führen zu einem exponentiellen Anstieg der plasmatischen F2a-Aktivität (Fischer *et al.*, 1996). Aktivierter Faktor 13 (F13a) führt zu einer Quervernetzung der Fibrinpolymere. Dadurch ist das entstehende Fibringerinnsel ausreichend stabil (Greenberg & Miraglia, 1985).

Thrombin gilt als einer der potentesten physiologischen/pathophysiologischen Plättchenaktivatoren, indem es mit mindestens zwei verschiedenen Plasmamembranrezeptoren interagiert (Jamieson, 1997). Daneben induziert das Enzym bei vaskulären Glattmuskelzellen Proliferations- und Migrationsprozesse und beeinflusst die Endothelzellen (Stouffer & Runge, 1998).

Abb. 8 auf der nächsten Seite zeigt das Schlüsselenzym in seiner Rolle als thrombogenes Enzym in der Gerinnungskaskade und umfasst die im Wesentlichen prokoagulanten Reaktionen. Die gestrichelten Linien stellen positive Feedbackmechanismen dar.

Die Blutgerinnung wird nach vaskulärem Schaden und der Freisetzung von tissue factor (extrinsisch) oder Zellfragmenten (intrinsisch) in das zirkulierende Blut initiiert. Thrombin aktiviert Plättchen und andere prokoagulatorische Proteine im Sinne zahlreicher positiver Feedbackmechanismen. Aktivierte Plättchen bieten eine phospholipidreiche Oberfläche, die die Enzymkomplexbildung verstärkt. Plättchenaggregate sind durch den Von-Willebrand-Faktor an dem verletzten Endothel verankert und fördern die Entstehung eines festen Fibringerinnsels (Gentry, 2004; Stief, 2012a).



TF: tissue factor, F: Faktor, PL: Phospholipid, vWF: Von-Willebrand-Faktor, Ca²⁺: Calcium-Ionen, HMWK: high molecular weight kininogen

Abbildung 8: Schematisches Diagramm der Blutgerinnungskaskade mit ihrem Schlüsselenzym Thrombin modifiziert nach Gentry, 2004

1.3 Antikoagulantien

Glykosaminoglykane gehören zu den wichtigsten physiologischen Antikoagulantien (Winkler *et al.*, 2007). Heparin ist eine Mischung aus Glykosaminoglykanen mit einer Molmasse von 3000 - 30.000 Dalton (Tanaka *et al.*, 2009). Die Entwicklung möglichst physiologischer niedermolekularer Heparine (NMH) ist der bislang größte Fortschritt in der

Prophylaxe und Therapie von Mikrothromben/Thromben (Mann *et al.*, 2006).

In den vergangenen zehn Jahren haben die NMH im Vergleich zu den unfractionierten Heparinen (UFH) kontinuierlich sowohl in der Prophylaxe als auch in der Therapie an Bedeutung gewonnen und werden heutzutage meist bevorzugt angewendet (Arbogast, 2004).

NMH nehmen einen stetig wachsenden Anteil in der Standardprophylaxe für tiefe Venenthrombosen bei perioperativen Patienten ein (Douketis *et al.*, 2008).

Im Vergleich zu UFH besitzen NMH den Vorteil einer exzellenten Bioverfügbarkeit, einer langen Halbwertszeit (3 - 6 h), weniger Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) und weniger Blutungskomplikationen (Hirsh *et al.*, 2001).

Abb. 9 zeigt die Molekulargewichte von NMH im Vergleich zum Heparin.

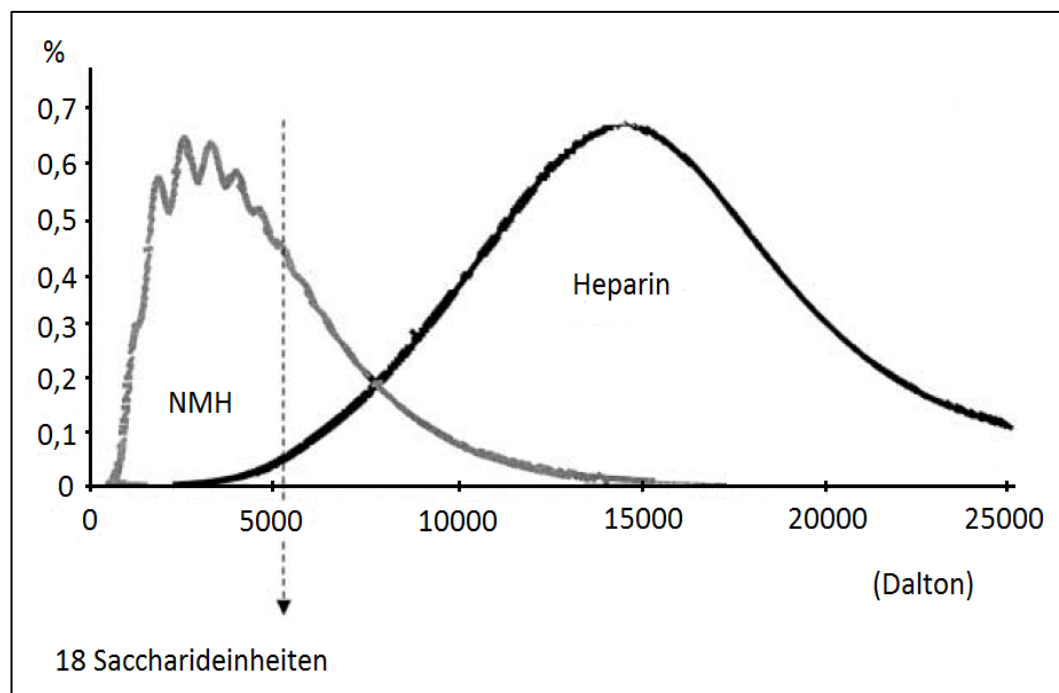


Abbildung 9: Molekulargewichtsverteilung von Heparin und niedermolekularem Heparin nach Harenberg & Fenyvesi, 2004

Studien belegen eine höhere Sicherheit und Effektivität von NMH im Vergleich zu normalem Heparin (Massicotte *et al.*, 2003).

Glykosaminoglykane wie Heparin erhöhen die Aktivität des Antithrombins,

was zu einer effektiven Hemmung von Thrombin und von der Thrombinbildung führt (Mousa, 2010).

Sowohl Heparin als auch NMH besitzen eine inhibierende Wirkung auf F10a (Hirsh *et al.*, 2001). Mit Abnahme des Molekulargewichts fällt sie jedoch deutlich bei Thrombin, F11a und F12a ab.

Thrombin wird erst durch ein Heparin mit einer Kettenlänge von mindestens 12 Sacchariden inhibiert, was bedeutet, dass NMH auf Grund ihrer kürzeren Kettenlänge Thrombin nur geringfügig inhibieren (Harenberg & Fenyvesi, 2004).

Die Effizienz der verabreichten NMH-Dosis könnte bei niedriger AT3-Aktivität reduziert sein. Zudem lassen sich niedrige AT3-Spiegel bei Schwangeren, schweren Verbrennungen, hepatischer Dysfunktion, Sepsis und dem Gebrauch von Asnase finden (Menache *et al.*, 1992).

2. Zielstellung und Folgerung

Asparaginase ist ein Enzym, das die Hydrolyse von Asparagin (ASN) zu Aspartat und Ammoniak katalysiert (Cooney & Handschumacher, 1970). Asparagin gilt insbesondere für Blasten der ALL und NHL als essentielle Aminosäure. Ein Mangel wirkt sich daher hemmend auf die Proteinsynthese der Tumorzellen aus, was zum Untergang der Zellen führt (Kiriya *et al.*, 1989).

Im klinischen Alltag wird das bakterielle Enzym Asparaginase schon seit den 60er Jahren erfolgreich verwendet (Wriston & Yellin, 1973). Es wird heute u.a. in Kombination mit anderen Zytostatika und Glukokortikoiden in der Therapie der ALL oder Non-Hodgkin-Lymphome eingesetzt (Ortega *et al.*, 1977; Clavell *et al.*, 1986). Das Enzym hat im Verlauf der Jahre immer mehr an Bedeutung gewonnen, weist aber auch ein breites Spektrum an Nebenwirkungen auf (Müller & Boos, 1998; Narta *et al.*, 2007).

Asparaginase wirkt stark auf die Hämostase. Sie ist dafür bekannt, die plasmatische Gerinnung zu modulieren, was zu pathologisch disseminierter intravaskulärer Gerinnung (PDIC) oder Blutungen führen kann (Nowak-Göttl *et al.*, 2003; Appel *et al.*, 2006). Die Thrombin-Generierung kann dementsprechend ansteigen, was in PDIC resultiert, oder abfallen, was zu Blutungen führt (Barbui *et al.*, 1993). Laut Studienergebnissen entwickelten ungefähr 1/3 der Patienten, die mit Asparaginase und Glukokortikoiden behandelt wurden, Thrombosen (Payne & Vora, 2007).

Die Gabe von NMH könnte gegen die thrombotischen Nebenwirkungen schützen (Elhasid *et al.*, 2001). Eine modellierte Form des bakteriellen Enzyms, die PEG-Asnase, besitzt eine längere Halbwertszeit, ist weniger immunogen und könnte zudem weniger prothrombotisch wirken (Avramis & Tiwari, 2006; Dinndorf *et al.*, 2007).

Der RECA ist ein innovativer hochsensitiver und hochspezifischer Thrombin-Generierungstest (Stief, 2006a, Stief, 2006b, Stief, 2008c).

Es war das Ziel dieser Arbeit, die plasmatische Thrombin-Generierung mittels RECA in normalen Citratplasma-Proben, die mit Asparaginase versetzt wurden, zu quantifizieren (Stief, 2006a; Stief, 2009).

Die Arbeit gliedert sich in vier Teile: Es wurden

1. normale Citratplasma-Proben mit nativer *E. coli* Asparaginase (neue Charge) supplementiert
2. normale Citratplasma-Proben mit nativer *E. coli* Asparaginase einer anderen Herstellungs-Charge (alte Charge) supplementiert
3. normale Citratplasma-Proben mit Asnase oder PEG-Asnase supplementiert
4. normales Citratplasma mit NMH und Asnase supplementiert

und die jeweiligen Auswirkungen auf die plasmatische Blutgerinnung anhand der Thrombin-Generierung mittels des innovativen RECA untersucht.

Fragestellung

Hat die Asparaginase Auswirkungen auf das plasmatische Gerinnungssystem? Wenn ja:

- Ist sie eher pro- oder antithrombogen?

Gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen Asparaginase-Präparationen?

- Ist die PEG-Asnase im Vergleich zur nativen Asnase weniger prothrombotisch?

Können hämostatische Komplikationen während des Therapieverlaufes mit der Asparaginase vorgebeugt werden?

- Schützt niedermolekulares Heparin das Plasma vor der Asnase-induzierten pathologischen Thrombin-Generierung?
- Können Hämostasiserisiko-Patienten identifiziert werden?

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden folgende Materialien verwendet:

- U-well Polystyrene Mikrotiterplatten (Brand, Wertheim, Deutschland, Artikelnummer 701300 oder pure grade untreated)
- Eppendorf Multipipette® und die dazugehörigen Polypropylen-aufsätze, die bei jeder Benutzung mit 0,9 % Natriumchlorid (NaCl) Lösung frisch durchspült und geleert wurden und vor Zugabe von Calciumchlorid (CaCl_2) frisch ausgetauscht und nochmals gespült wurden.
- 5 ml Polypropylen-Röhrchen, bereits versetzt mit 0,5 ml 106 millimolarem (mM) Natriumcitrat (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- silikonisierte Glasfläschchen (Dade Behring, Marburg, Deutschland, Artikelnummer OVKE49)
- 0,9 % NaCl Lösung zum Durchspülen der Pipetten
- 250 mM CaCl_2 (RECA-trigger), das in 1 ml Aliquoten in silikonisierten Glasfläschchen bei - 30°C eingefroren war und für jeden Versuch bei 23°C aufgetaut wurde und dann verworfen wurde.
- Arginin Stop Reagenz bestehend aus 2,5 molarem (M) Arginin pH 8.6, 0,16 % Triton X100® (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- 1 mM chromogenes Substrat H-D-CHG-Ala-Arg-pNA•2AcOH Pefachrom® TH in 1,25 M Arginin pH 8.7 zur Bestimmung von Thrombin (Pentapharm, Basel, Schweiz)
- Rinderthrombin (Siemens Diagnostic, München, Deutschland)
- humanes Albumin (Kabi, Stockholm, Schweden)
- Heraeus Bio 13 Zentrifuge
- Platten-Rüttler
- Digital-kontrolliertes Wasserbad (37°C)
- Stoppuhren

- Mikrotiterplattenphotometer mit einer Auflösung von einem milli-absorbance (1 mA) (Milenia; DPC, Los Angeles, USA)
- niedermolekulares Heparin Enoxaparin (Aventis, Frankfurt, Deutschland)
- *E. coli* Asparaginasen (Medac, Hamburg, Deutschland)
 - Native *E. coli* Asnase, Charge-Nr. M80125 AE,
 - Native *E. coli* Asnase, Charge-Nr. M60720AA,
 - Modifizierte *E. coli* Asnase, PEG-Asnase, Oncaspar®, Charge-Nr. M71002AC,

Asnase ist sowohl bei - 20°C als auch bei einem Tag Raumtemperatur stabil.

Es ergab sich kein Unterschied in den Thrombin-Generierungskurven mit frisch-rekonstituierter lyophilisierter Asparaginase im Vergleich zu eingefrorener/aufgetauter Asparaginase.

Die verwendeten Plasmaproben waren nicht gefrorene normale Plasmen. Sie waren zum Zeitpunkt 4 ± 2 Stunden alt und wurden bei einer Temperatur von 23°C gelagert. Die basale plasmatische Thrombinaktivität der Proben lag bei $0,01 \pm 0,002$ international unit pro Milliliter (IU/ml) Thrombin; (Mittelwert ± 1 Standardabweichung).

Außerdem wurden Frischplasmaproben verwendet, die nicht älter als eine Stunde waren. Sie wurden in Citratröhrchen (0,5 ml 106 mM Natriumcitrat + 4,5 ml Blut in Polypropylen-Röhrchen von Sarstedt) abgenommen und bei 2800 g für zehn Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma sofort für die Versuche verwendet.

Alle verwendeten Plasmaproben wurden nach schriftlicher Einverständniserklärung untersucht.

3.2 Verwendete Methoden: RECA (recalcified coagulation activity assay)

Der RECA misst hochspezifisch und hochsensitiv die Thrombin-Generierung im Plasma. Er imitiert die physiologische oder pathophysiologische Thrombin-Generierung im Plasma (Stief, 2009).

Tabelle 3 zeigt das Schema zur Messung der Thrombin-Generierung, die sich in eine Thrombin-Generierungsphase und Thrombin-Detektionsphase einteilt. Die Thrombindetektionsphase beginnt erst nach drei Minuten, weil das Arginin-Stop-Reagenz diese Zeit benötigt, um nichtvernetztes Fibrin zu depolymerisieren (Mosesson, 2007; Stief, 2007). Die generierte Menge Thrombin wird dabei am Ende anhand des linearen Anstiegs der Absorption pro Zeit ($\Delta A/t$) gemessen.

Phase 1: Thrombin-Generierungsphase
50 μ l Citratplasma in sehr guten Mikrotiterplatten 5 μ l 250 mmol/l CaCl_2 0 - 20 min (37°C) 100 μ l Arginin Stop Reagenz [2,5 M Arginin pH 8.7, 0,16 % Triton X100 ® (Stief, 2007)]
Phase 2: Thrombin-Detektionsphase
3 Minuten 25 μ l 1 mmol/l Thrombinsubstrat-Reagenz in 1,25 M Arginin Bestimmung des linearen Anstiegs der Absorption pro Zeit ($\Delta A/t$)

Tabelle 3: Schema zum recalcified coagulation activity assay nach Stief, 2009

Der RECA wurde durch Ersatz der Plasmaprobe mit 0,1 IU/ml oder 1 IU/ml Rinderthrombin (1 mg = 2525 IU) gelöst in 6,7 % humanem Albumin (Salze und Phosphate beinhaltend) standardisiert.

Der maximale Absorptionsanstieg lag bei 1050 mA, die Linearität des Extinktionsanstieges zur Thrombinaktivität ist gegeben bis zu 40 % des maximalen Absorptionsanstiegs, was also ungefähr 420 mA entspricht. Der RECA hat intra-assay Variationskoeffizient-Werte kleiner 10%.

3.3 Versuchsdurchführung

Der Hauptteil der Arbeit gliedert sich in drei verschiedene Versuchsteile, bei denen jeweils unterschiedliche Asparaginase den Plasmaproben zugesetzt wurden. Nach Aufbrauchen der ersten nativen *E. coli* Asparaginase wurde eine neue Charge der nativen *E. coli* Asparaginase bestellt und erneut untersucht. Ein direkter Vergleich beider Chargen war nicht Gegenstand der Arbeit. Die beiden zugesetzten nativen *E. coli* Asparaginase aus den ersten beiden Versuchsteilen unterschieden sich lediglich in ihrem Herstellungsdatum. Anschließend wurde die Thrombin-Generierung mittels dem RECA und die zugehörigen IC50- und SC200-Werte (siehe unten) bestimmt.

3.3.1 RECA unter Zugabe nativer *E. coli* Asparaginase zu normalen Plasmaproben

50 µl Plasma von n = 57 individuellen normalen Proben, eine normale Frischplasmaprobe und n = 7 normale Plasmapools, hergestellt aus jeweils 7 ± 1 individuellen Proben, wurden in sehr gute Mikrotiterplatten versetzt. Bei der Überführung des Plasmas in die Platten wurde genauestens darauf geachtet, keine Thrombozyten mitanzusaugen. Danach wurden die Proben mit 0 - 100 U/ml *Escherichia coli* Asparaginase (10.000 U/Originalampulle, Lieferungsnummer M80125AE) unter repetitiver 1 + 1 Verdünnung auf die Platte versehen.

Anschließend wurde der RECA zur Detektion der Thrombin-Generierung durchgeführt. Der Test wurde unter Zugabe von 5 µl 250 mM CaCl₂ gestartet, wobei die frischen Pipettenaufsätze der Eppendorf-Multipipette® vor Anwendung mit 0,9 % NaCl Lösung durchgespült und vollständig geleert wurden, um Polypropylen-Reste zu beseitigen.

Nach intensivem Rütteln der Mikrotiterplatten für fünf Sekunden wurden sie anschließend in einem digital kontrollierten Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C inkubiert.

Im Anschluss wurde dann nach 0 - 20 Minuten (oder 0 - 30 Minuten) Gerinnungs-Reaktions-Zeit (coagulation reaction time = CRT) jeweils 100 µl Arginin Stop Reagenz (2.5 M Arginin pH 8.7, 0.16 % Triton X100®) hinzugefügt. Da das jeweils untersuchte Plasma unterschiedlich

voraktiviert war, wurden jeweils unterschiedliche CRTs verwendet. Plasma ist nur bis zu zwei Stunden als frisch anzusehen, danach wird es sukzessive voraktivierter. Das heißt je voraktivierter das Plasma war, umso kürzer die gewählte CRT. Drei Minuten nach der letzten CRT Periode wurden 25 µl 1 mM chromogenes Substrat gelöst in 1.25 M Arginin dazu pipettiert.

Danach wurde der Anstieg der Absorption bei 405 Nanometern (nm) pro Zeit ($\Delta A/t$) mit einem Mikrotiterplattenphotometer (Milenia; DPC, Los Angeles USA) bestimmt.

Anschließend wurden die 200 % stimulatory concentration (SC200) und die 50 % inhibitory concentration (IC50) bestimmt (siehe Kapitel 3.4).

3.3.2 RECA unter Zugabe nativer *E. coli* Asparaginase gleicher Produktart, aber mit älterem Herstellungsdatum, zu normalen Plasmaproben

50 µl Plasma von $n = 46$ individuellen normalen Proben und von $n = 3$ normalen Pools, hergestellt aus 7 ± 1 individuellen Proben, wurden in sehr gute Mikrotiterplatten versetzt. Diese wurden mit Asparaginasekonzentrationen von 0 - 200 U/ml versehen. Die unter repetitiver 1+1 verdünnten Proben wurden mit dem RECA mit CRTs von 0 - 20 (oder 0 - 30) Minuten analysiert. Abschließend folgten die IC50- und SC200-Bestimmungen, sofern vorhanden.

Zum Vergleich der beiden nativen Asparaginasen aus den Versuchsteilen 1 und 2, die sich lediglich im Herstellungsdatum unterschieden, wurde eine Frischplasmaprobe, die nicht älter als eine Stunde war, mit den beiden Asparaginasen versehen und analog zum Vorgehen der vorherigen Versuche ausgewertet.

3.3.3 RECA unter Zugabe von modifizierter *E. coli* Asparaginase (PEG-Asnase) und nativer *E. coli* Asparaginase zu normalen Plasmaproben

40 µl Plasma von $n = 14$ individuellen normalen Proben und von $n = 2$ normalen Pools, hergestellt aus 7 ± 1 individuellen Proben, wurden in sehr gute Mikrotiterplatten überführt und mit 0 - 100 U/ml der nativen

oder der modifizierten Form der PEG-Asnase in repetitiver 1 + 1 Verdünnung versetzt. Danach folgte die Durchführung des RECA analog zum ersten Versuchsteil mit CRTs von 0 - 15 Minuten und die Auswertung der IC50 und SC200, sofern vorhanden.

3.3.4 RECA unter Zugabe von Enoxaparin und Asparaginase zu normalen Plasmaproben

In diesem letzten kleinen Zusatzteil wurden verschiedene individuelle Plasmen gepoolt und dieser Pool mit unterschiedlichen Konzentrationen an niedermolekularem Heparin (Enoxaparin) versetzt und im sofortigen Anschluss mit Asparaginase versehen.

50 µl normales, aus neun individuellen normalen Proben gewonnenes gepooltes Citratplasma, wurde in sehr gute Mikrotiterplatten unter der Zugabe von 0 - 0,26 IU/ml Enoxaparin überführt. Unmittelbar folgend wurden 2 µl 5000 U/ml Asnase oder 0,9 % NaCl dazu pipettiert, wobei die Pipettenaufsätze vor Zugabe der Asparaginase/NaCl-Lösung immer neu durchgespült wurden. Es resultierten plasmatische Asparaginaseaktivitäten von 0 U/ml oder 192 U/ml. Danach folgte der RECA mit CRTs von 0, 10 oder 20 Minuten. Es wurde die Enoxaparinkonzentration bestimmt, bei der 50 % der Thrombin-Generierung inhibiert waren (IC50).

3.4 Versuchsauswertung: Bestimmung der SC200- und IC50-Konzentration

Nach Versuchsdurchführung wurde - sofern möglich - die approximative (approx.) 50 % inhibitory concentration (IC50) und die approximative 200 % stimulatory concentration (SC200) der Asparaginase bestimmt. Die SC200 ist die Asparaginasekonzentration, bei der 200 % der Thrombin-Generierung von unsupplementiertem Plasma erreicht werden. Die IC50 ist die Asparaginase-Konzentration, bei der nur noch 50 % der Thrombin-Generierung von unsupplementiertem Plasma erreicht werden. Approx. SC200 bedeutet approximative SC200, approx. IC50 bedeutet approximative IC50.

Diese approx. Konzentrationen wurden mit Lin-Lin plots (Standard-EXCEL) von der plasmatischen Asparaginaseaktivität versus der

Thrombinaktivität gemessen, u.a. für RECA-5, RECA-8, RECA-10, RECA-15, RECA-20, d.h. RECA mit CRTs (coagulation reaction times) von 5, 8, 10, 15 oder 20 Minuten bestimmt.

Da alle Plasmen bereits vor der Recalzifizierung immer eine basale Thrombinaktivität enthalten (Thrombin gebunden im α_2 -Makroglobulin) (Stief, 2006a, Stief, 2012a) wird die Thrombin-Generierung im RECA wie folgt berechnet:

Thrombinaktivität nach einer bestimmten CRT minus basaler Thrombinaktivität. Die basale Thrombinaktivität wird beim RECA an der 0 Minuten-CRT-Kurve abgelesen (0 Minuten CRT = Plasma + Arginin-reagenz + Calciumreagenz + chromogenes Substrat).

Die normale basale Thrombinaktivität im EDTA-Plasma beträgt $5,5 \pm 1,1$ mIU/ml (MV \pm 1 SD) (Stief, 2006a).

In Citratplasma, das bis zu vier Stunden bei 23 °C gelagert wird, ist die normale basale Thrombinaktivität in der Regel um wenige mIU/ml höher, da EDTA das Plasma besser stabilisiert als Citrat (Stief, 2006a).

Für die Bestimmung der approximativen IC₅₀ oder SC₂₀₀ wird die RECA-Kurve mit den niedrigsten IC₅₀- und SC₂₀₀-Werten als sensibelste betrachtet und ausgewertet. Es werden nur die Thrombinaktivitäten berücksichtigt, die zum aufsteigenden Teil der Thrombin-Generierungskurve gehören, d.h. wo die Thrombinaktivität zu einem bestimmten Zeitpunkt niedriger ist als die zu einem darauffolgenden Zeitpunkt der Kurve (Stief, 2009). Die Thrombinaktivitäten im absteigenden Teil der Kurve sind in der Regel bedingt durch Antithrombin 1 = Fibrin (Mosesson, 2007).

Wenn zu einer bestimmten CRT kein Anstieg der Plasmatrübung vorhanden ist, dann kann die zugehörige Thrombin-Aktivität auch gültig sein (Stief, 2009).

4. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war, die Thrombin-Generierung nach Zugabe von verschiedenen Asparaginase-Präparationen (native *E. coli* Asparaginase, PEG-Asparaginase) zu analysieren.

Die Versuche quantifizierten die prothrombotische (oder antithrombotische) Potenz der jeweiligen Asparaginase.

Um die Auswirkungen der Asparaginase auf die plasmatische Gerinnung zu veranschaulichen, werden in dieser Arbeit eine große Anzahl exemplarischer Kurven der plasmatischen Thrombin-Generierung durch Asparaginase-Zusatz gezeigt.

Im Folgenden werden die individuellen Plasmaproben nach Zusatz der Asparaginase in Bezug auf ihre Thrombin-Generierung gegenüber der Gerinnungs-Reaktions-Zeit (coagulation reaction time = CRT) und gegenüber der Asparaginase-Konzentration (Asparaginase conc.) abgebildet.

Für die ersten beiden Versuchsteile gehören zu jedem untersuchten Plasma jeweils zwei Abbildungen.

Abbildung a) zeigt exemplarisch Thrombin-Generierungskurven mit unterschiedlichen Asparaginase-Konzentrationen, die zum Plasma zugesetzt wurden, bei einer CRT von 0 - 20 Minuten (min). Die Gerinnungs-Reaktions-Zeit wurde auf der x-Achse des Koordinatensystems gegenüber der daraus resultierenden Thrombin-Aktivität (Thrombin activity), gemessen in international unit pro Milliliter (IU/ml), auf der y-Achse aufgetragen.

Abbildung b) zeigt Kurven, aufgetragen in einem Koordinatensystem mit der Asparaginase-Konzentration (Asparaginase conc.), gemessen in unit pro Milliliter (U/ml) auf der x-Achse und der generierten Thrombin-Aktivität auf der y-Achse.

Für jedes Plasma wurde - sofern vorhanden - die approximative 200 % stimulatory concentration (approx. SC200) oder die approximative 50 % inhibitory concentration (approx. IC50) der jeweiligen Asparaginase bestimmt. Die approx. SC200 ist die Asparaginase-Konzentration, bei der ca. 200 % der ursprünglichen Thrombin-Generierung auftreten.

Die IC50 ist die Asparaginase-Konzentration, bei der nur noch 50 % der Thrombin-Generierung erfolgt, verglichen mit der Thrombin-Generierung in unsupplementiertem Plasma.

Für die Bestimmung der approx. SC200 oder approx. IC50 wird die RECA-Kurve mit den niedrigsten approx. SC200- oder approx. IC50-Werten als sensibelste betrachtet und gewertet. Es werden nur die Thrombin-Aktivitäten berücksichtigt, die zum aufsteigenden Teil der Thrombin-Generierungskurve gehören, d.h. wo die Thrombin-Aktivität zu einem bestimmten Zeitpunkt niedriger ist als die, die zu einem darauffolgenden Zeitpunkt der Kurve folgt. Die Thrombin-Aktivitäten im absteigenden Teil der Kurve sind in der Regel bedingt durch Antithrombin 1 (nascent fibrin) (Mosesson, 2007).

Normale Thrombin-Generierungskurven ohne Zusatz von Asparaginase (dunkelblaue Kurve Symbol “♦“ in allen CRT-Figuren) sind bis zu dem Moment hyperbolisch, wo Antithrombin 1 noch nicht signifikant die Thrombin-Aktivität inhibiert (Stief, 2009). Der Moment der signifikanten Antithrombin 1-Wirkung ist in der Regel durch einen signifikanten Anstieg der Plasmatrübung (entstehendes Fibrin) nachweisbar. Folglich gilt: wenn bei einer bestimmten CRT kein Anstieg der Plasmatrübung vorhanden ist, dann kann die zugehörige Thrombin-Generierung auch gültig sein (Stief, 2009).

Da nur die Thrombinaktivitäten berücksichtigt werden, die zum aufsteigenden Teil der Kurve gehören, werden im Folgenden die (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht validen abfallenden Teile der Kurven in den Abbildungen gestrichelt dargestellt oder ganz weggelassen.

Die beiden nativen *E. coli* Asparaginasen der gleichen Produktart, die sich lediglich in ihrem Herstellungsdatum unterscheiden, werden im folgenden Asparaginase „alte Charge“ und Asparaginase „neue Charge“ genannt. Dabei ist die Asparaginase „alte Charge“ diejenige mit dem älteren Herstellungsdatum im Vergleich zur „neuen Charge“.

4.1 RECA mit Plasmaproben unter Zugabe von nativer *E. coli* Asparaginase (neue Charge)

Insgesamt wurden 57 individuelle Plasmaproben, sieben daraus hergestellte Pools und ein Frischplasma nach Zusatz des Enzyms analysiert. Die Ergebnisse der 57 individuellen Plasmen mit den dazugehörigen IC50- und SC200-Durchschnittswerten werden in Tabelle 4 zusammengefasst.

Anzahl der Plasmen	Approx. SC200-Durchschnittswert	Approx. IC50-Durchschnittswert
29	6 U/ml	--
12	--	6 U/ml
14	40 U/ml	4 U/ml
2	--	--

Tabelle 4: Auswertung der 57 Plasmaproben zugesetzt mit nativer *E. coli* Asparaginase

Für 29 Plasmaproben (51 %) war nur eine SC200 messbar, wobei der Durchschnittswert bei ca. 6 U/ml Asparaginase lag. Zwölf Proben (21 %) besaßen lediglich einen messbaren IC50-Wert, mit einem Durchschnitt von 6 U/ml Asparaginase. 14 Proben (24,5 %) verfügten sowohl über einen SC200- als auch IC50-Wert, wobei die Durchschnitte bei jeweils 40 U/ml bzw. 4 U/ml lagen. Zwei Plasmaproben (3,5 %) wiesen weder eine SC200 noch eine IC50 auf.

Von den 29 individuellen Plasmaproben, die nur einen SC200-Wert demonstrierten, verfügten ungefähr

- 1/3 (10/29) eine approx. SC200 < 3 U/ml
- 1/3 (10/29) eine approx. SC200 von 3 - 20 U/ml
- und 1/3 (10/29) eine approx. SC200 > 20 U/ml

Somit lässt sich sagen, dass ungefähr die Hälfte aller Proben prothrombogen auf die Asnase wirkten, ungefähr 1/5 antithrombogen, 1/4 sowohl pro- als auch antithrombogen und ein minimaler Teil (2 %) zeigte keine Auswirkungen gegenüber der Asparaginase.

Im Folgenden werden die Abbildungen von individuellen Plasmaproben nach Zusatz der Asparaginase in Bezug auf ihre Thrombin-Generierung gegenüber der CRT und der Asparaginasekonzentration dargestellt.

Abb. 10-20 zeigen elf typische Thrombinaktivitätskurven für Plasmaproben, die nur über einen messbaren Asparaginase SC200-Wert verfügten. Die Spanne der SC200-Werte liegt dabei zwischen < 1 U/ml (Abb. 10) bis hin zu 100 U/ml Asparaginase (Abb. 20).

Abb. 21-25 stellen exemplarisch individuelle Plasmaproben, die nur einen IC50-Wert aufweisen, dar. Die abgebildeten approximativen IC50-Werte gehen hier von 1 U/ml (Abb. 21) bis zu 13 U/ml (Abb. 25).

Abb. 26-31 zeigen Beispiele, die sowohl einen IC50- als auch SC200-Wert besitzen. Die Spanne der Werte reicht hier von Proben mit einer approx. IC50 = 6 U/ml und approx. SC200 = 25 U/ml (Abb. 27) bis hin zu Proben mit einer approx. IC50 = 6 U/ml und approx. SC200 = 100 U/ml (Abb. 29).

Die Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma wurde exemplarisch in den Abbildungen 32-35 analysiert. Abb. 36 verdeutlicht die Durchschnittswerte der Thrombin-Generierung von allen durchgeführten Pools. Die approximative SC200 lag im Durchschnitt bei Werten von 6 U/ml Asparaginase.

Abb. 37 demonstriert die Durchschnittswerte der Thrombin-Generierung von allen $n = 57$ untersuchten normalen Plasmaproben. Aus diesen Durchschnittswerten ergeben sich weder eine approx. SC200 noch eine approx. IC50. Dies bedeutet, dass sich der Durchschnittswert der Plasmaproben so verhält, als ob die zugefügte Asparaginase keine modulatorische Aktivität auf das plasmatische Gerinnungssystem hätte. Allerdings besitzt die Asparaginase sehr wohl modulatorische Eigenschaften bei den meisten individuell analysierten Plasmaproben (siehe Abb. 10-36).

Abb. 38 illustriert die Durchschnittswerte der Thrombin-Generierung von Plasmen, die nur über eine SC200 verfügen. Die SC200 aller Werte lag im Durchschnitt bei 6 U/ml Asparaginase.

Der Durchschnittswert der Thrombin-Generierung bei Plasmen, die nur mit einer approx. IC50 versehen sind, wies genauso einen Wert auf, der

ungefähr bei 6 U/ml lag (Abb. 39). Plasmen, die sowohl eine IC₅₀ als auch SC₂₀₀ besaßen, demonstrierten als Durchschnittswerte eine approx. IC₅₀ von 4 U/ml und eine approx. SC₂₀₀ von 40 U/ml (Abb. 40). Auf den folgenden Seiten werden die Abb. 10-40 gesammelt dargestellt.

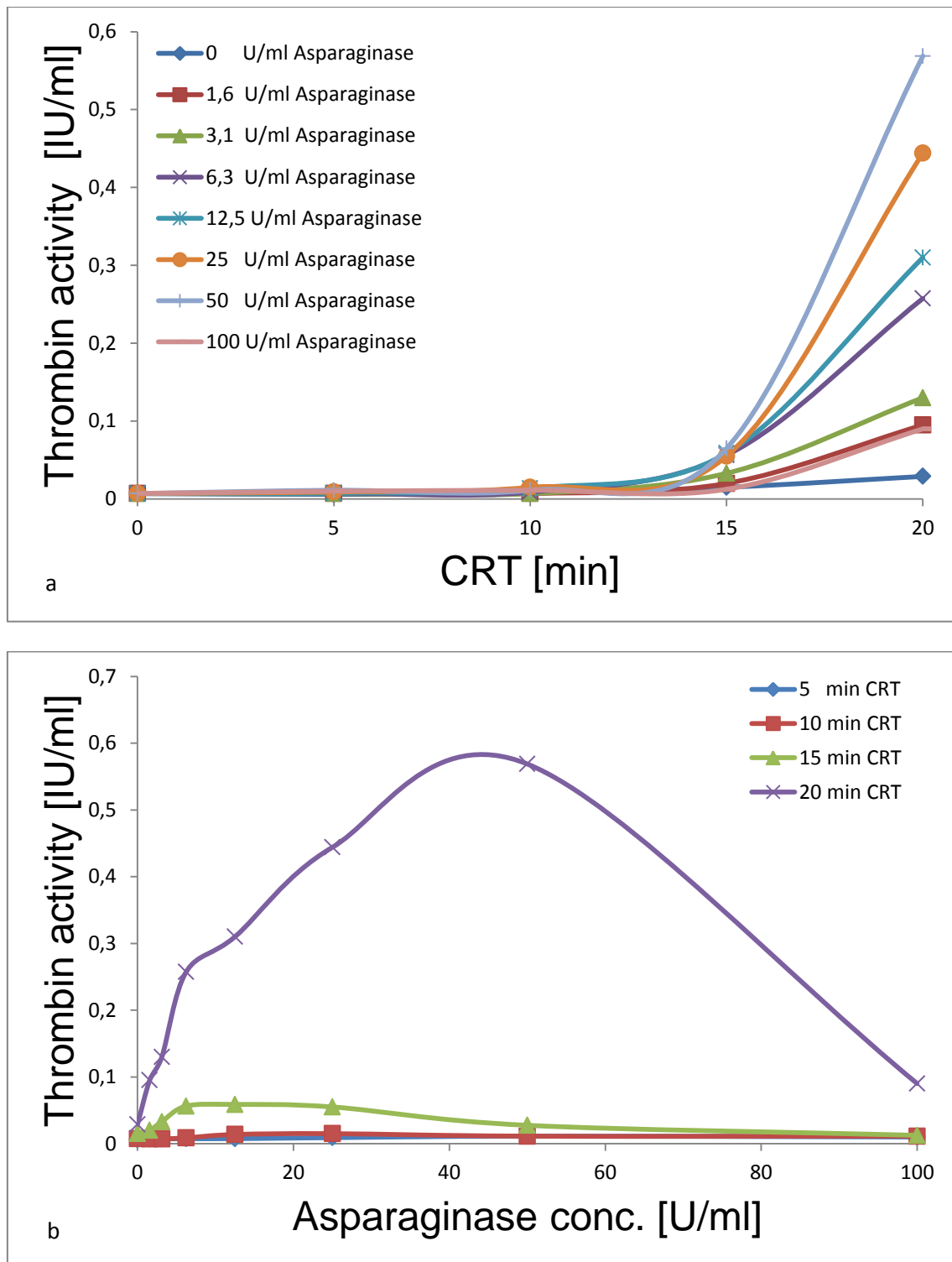


Abbildung 10: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde mit 0 - 100 U/ml Asnase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min coagulation reaction time (CRT) (b) durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei < 1 U/ml Asparaginase. Abb. 10a zeigt die hyperbole Reaktionskinetik: binnen der ersten 10 min CRT (37°C) wird fast kein Thrombin generiert, bei 15-20 min (37°C) entstehen ca. 0,05-0,5 IU/ml Thrombin. Abb. 10b zeigt, dass die sensibelsten Kurven die von RECA-15 und RECA-20 sind (15 min oder 20 min CRT). Asnasekonzentrationen größer 50 U/ml führen nicht mehr zur Erhöhung sondern zur Erniedrigung der Thrombinaktivität. Um die Thrombin-Generierung zu erhalten, muss von jeder Thrombinaktivität die basale Thrombinaktivität abgezogen werden.

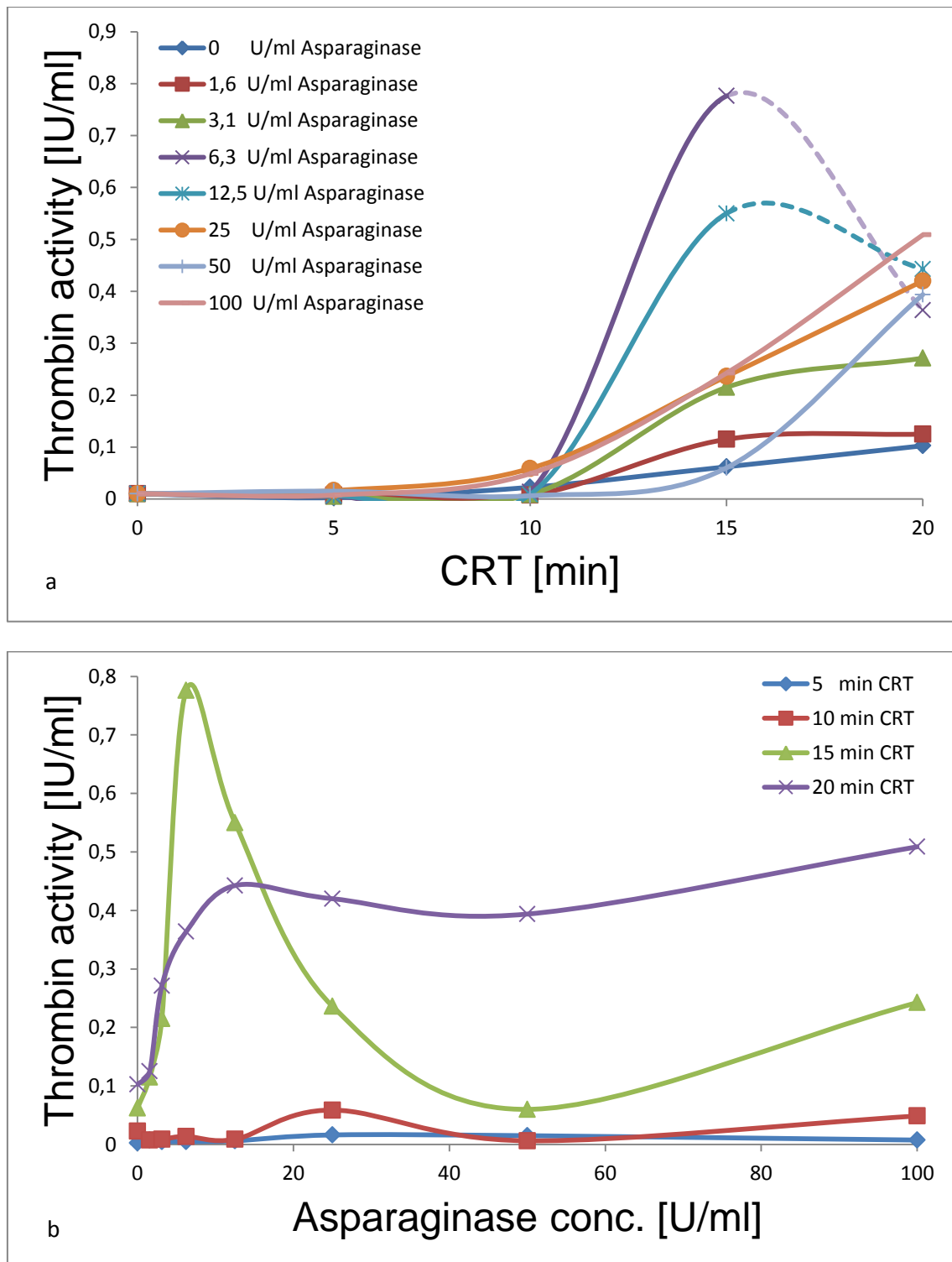


Abbildung 11: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 2 U/ml Asparaginase. Der (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht-valide Teil der Kurven in Abb. 11a wurde gestrichelt.

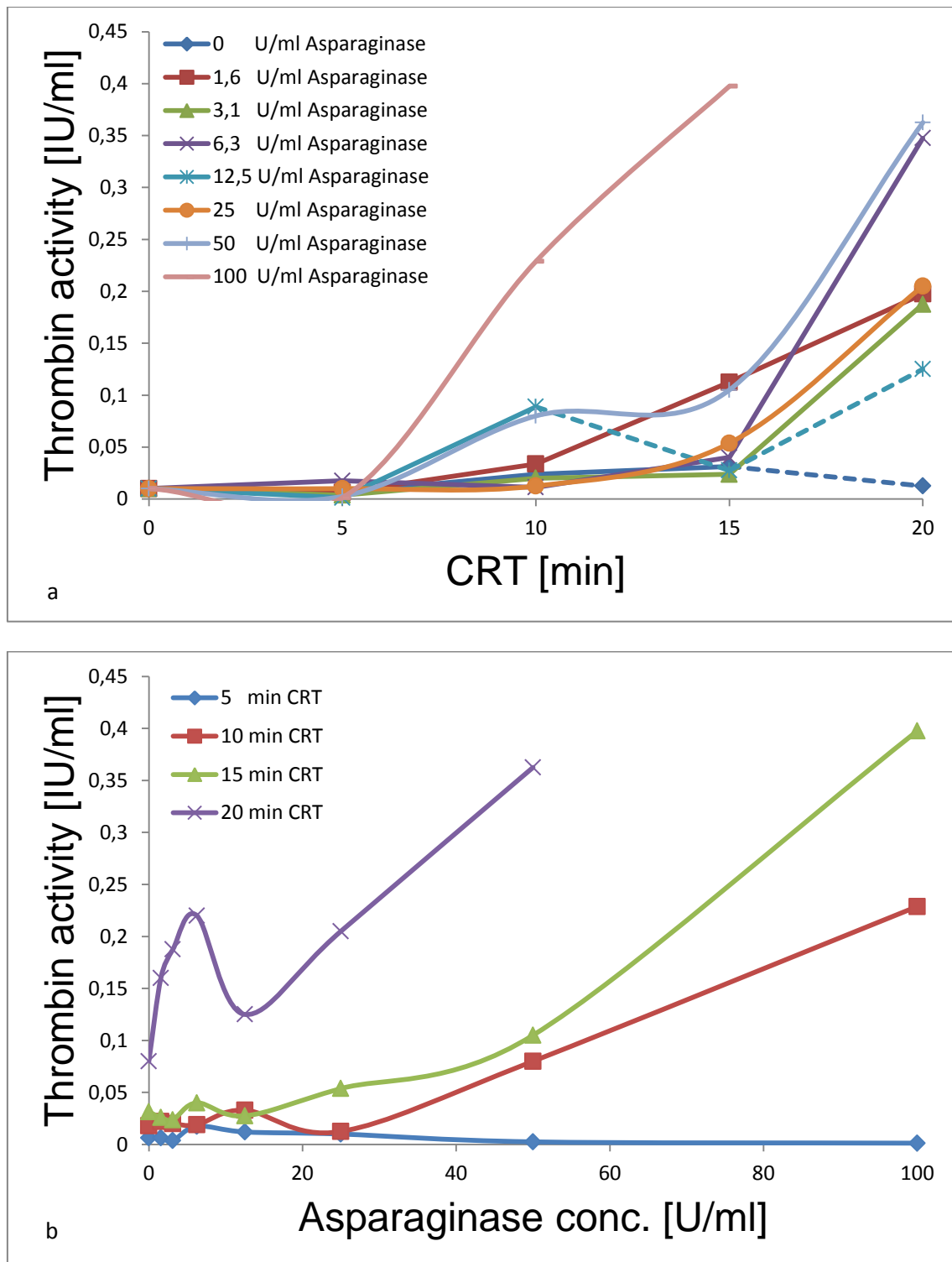


Abbildung 12: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 2 U/ml Asparaginase. Der (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht-valide Teil der Kurven in Abb. 12a wurde gestrichelt bzw. in Abb. 12b weggelassen.

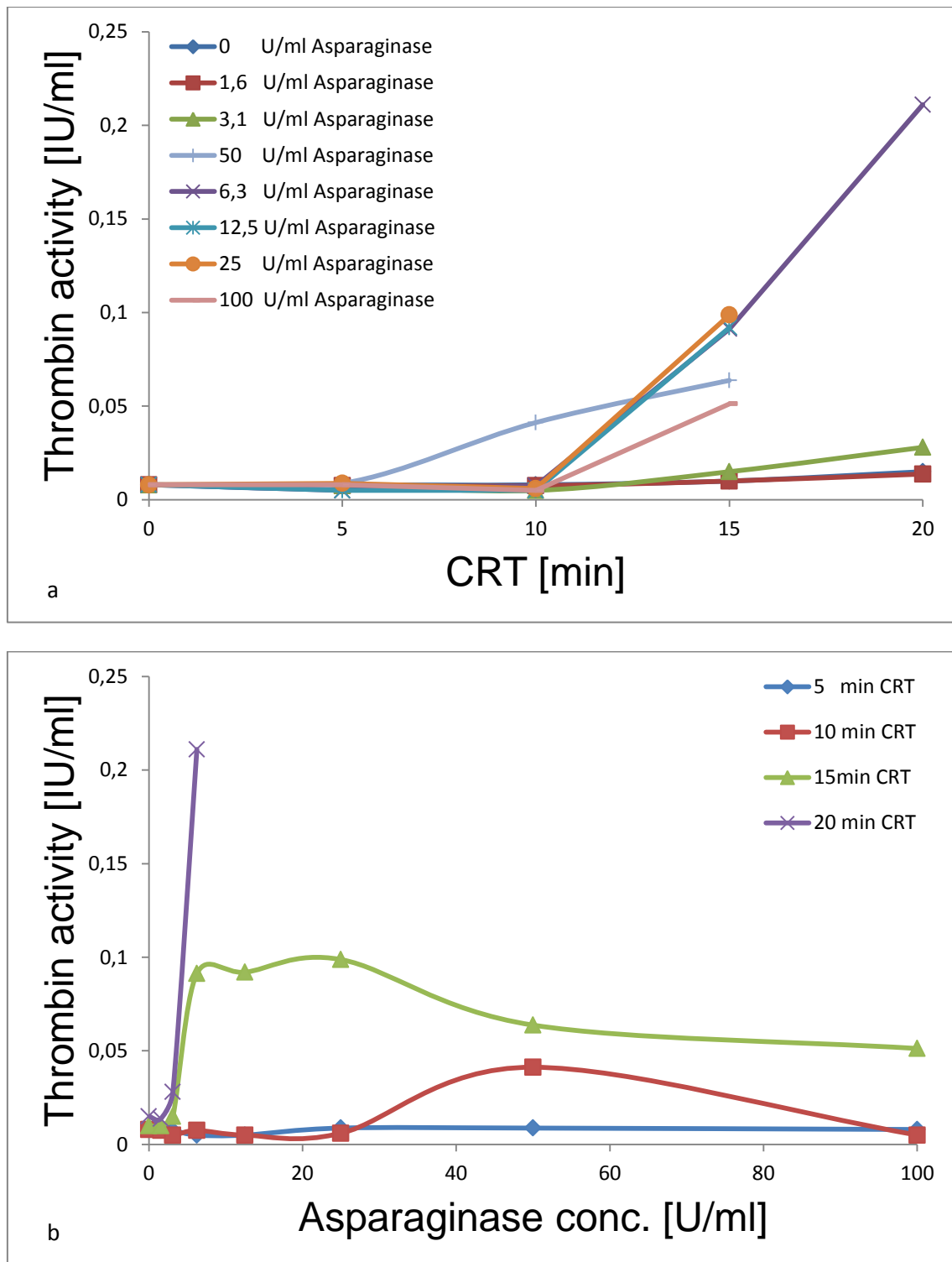


Abbildung 13: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 3 U/ml Asparaginase. Der (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht-valide Teil der Kurven wurde weggelassen.

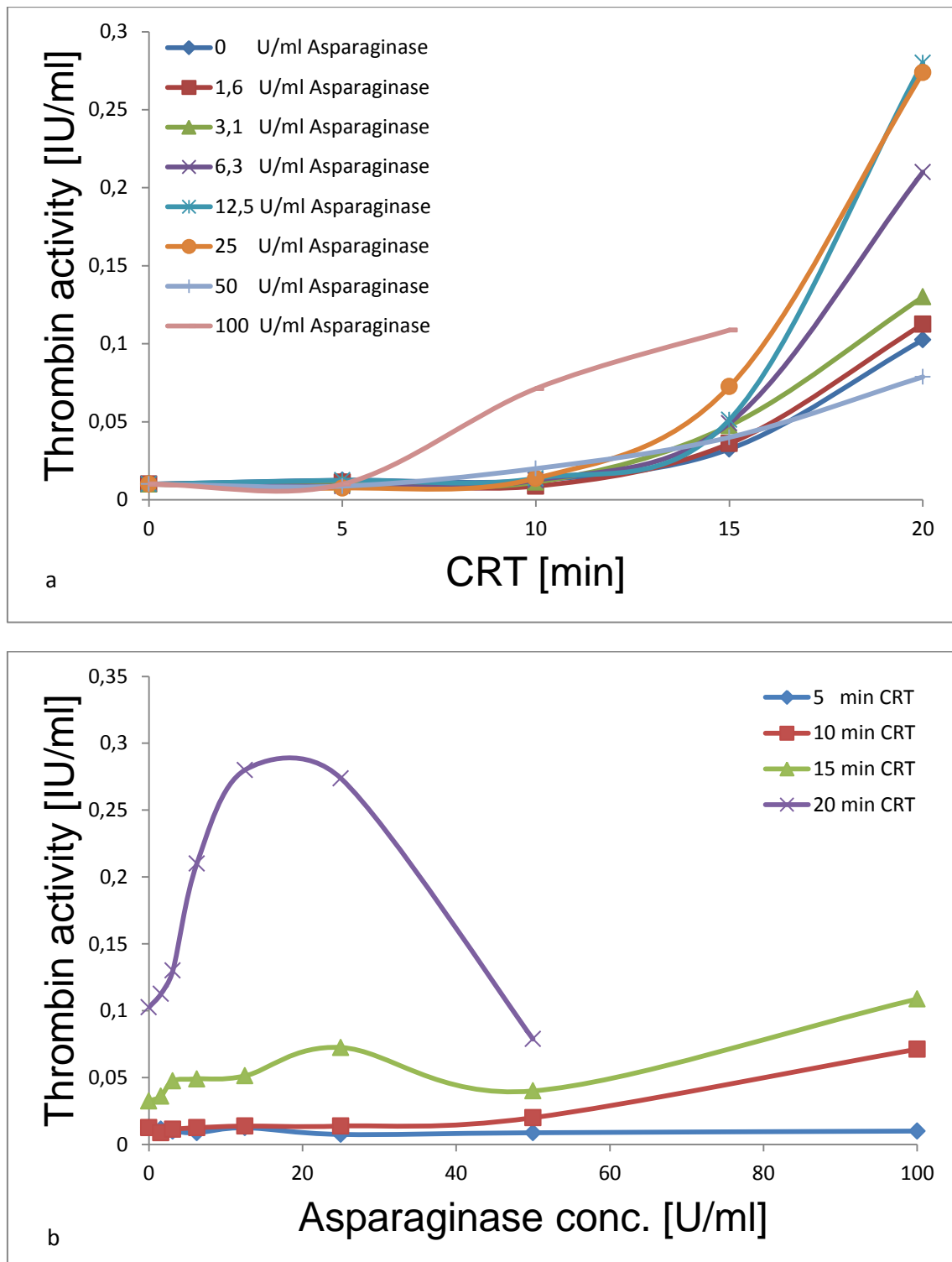


Abbildung 14: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 6 U/ml Asparaginase. Der (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht-valide Teil der Kurven wurde weggelassen.

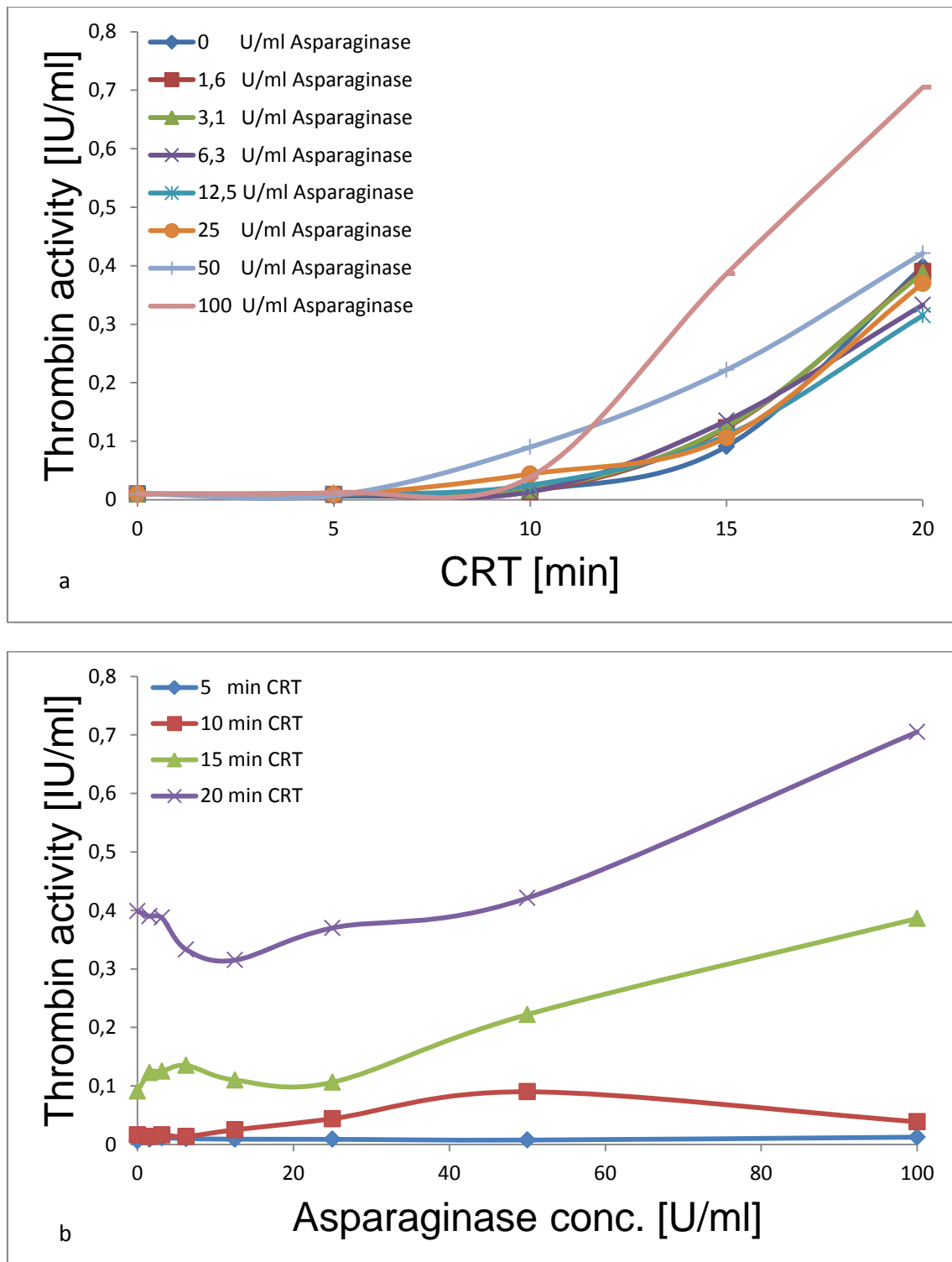


Abbildung 15: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 µl normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 10 U/ml Asparaginase.

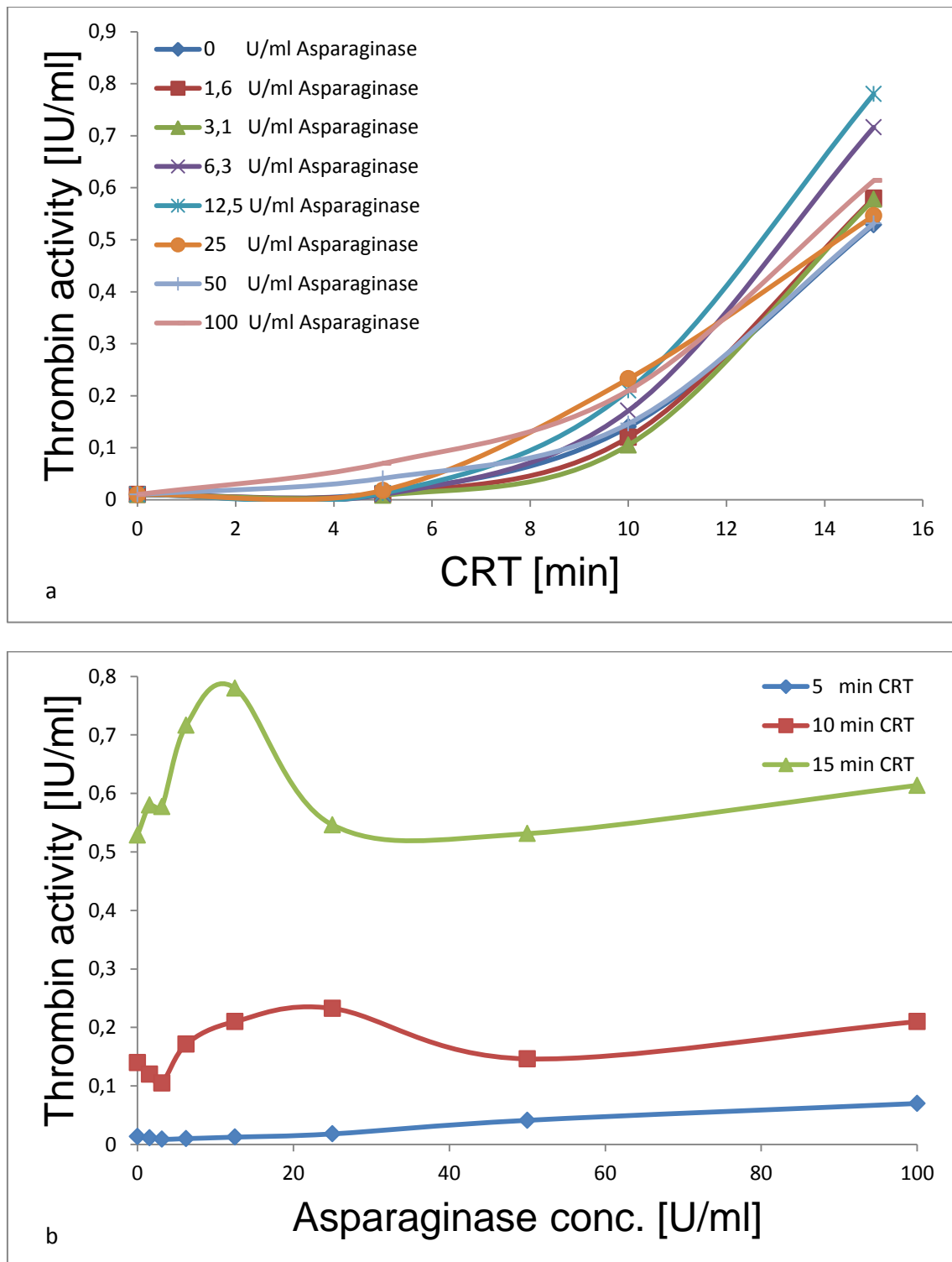


Abbildung 16: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 15 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 25 U/ml Asparaginase.

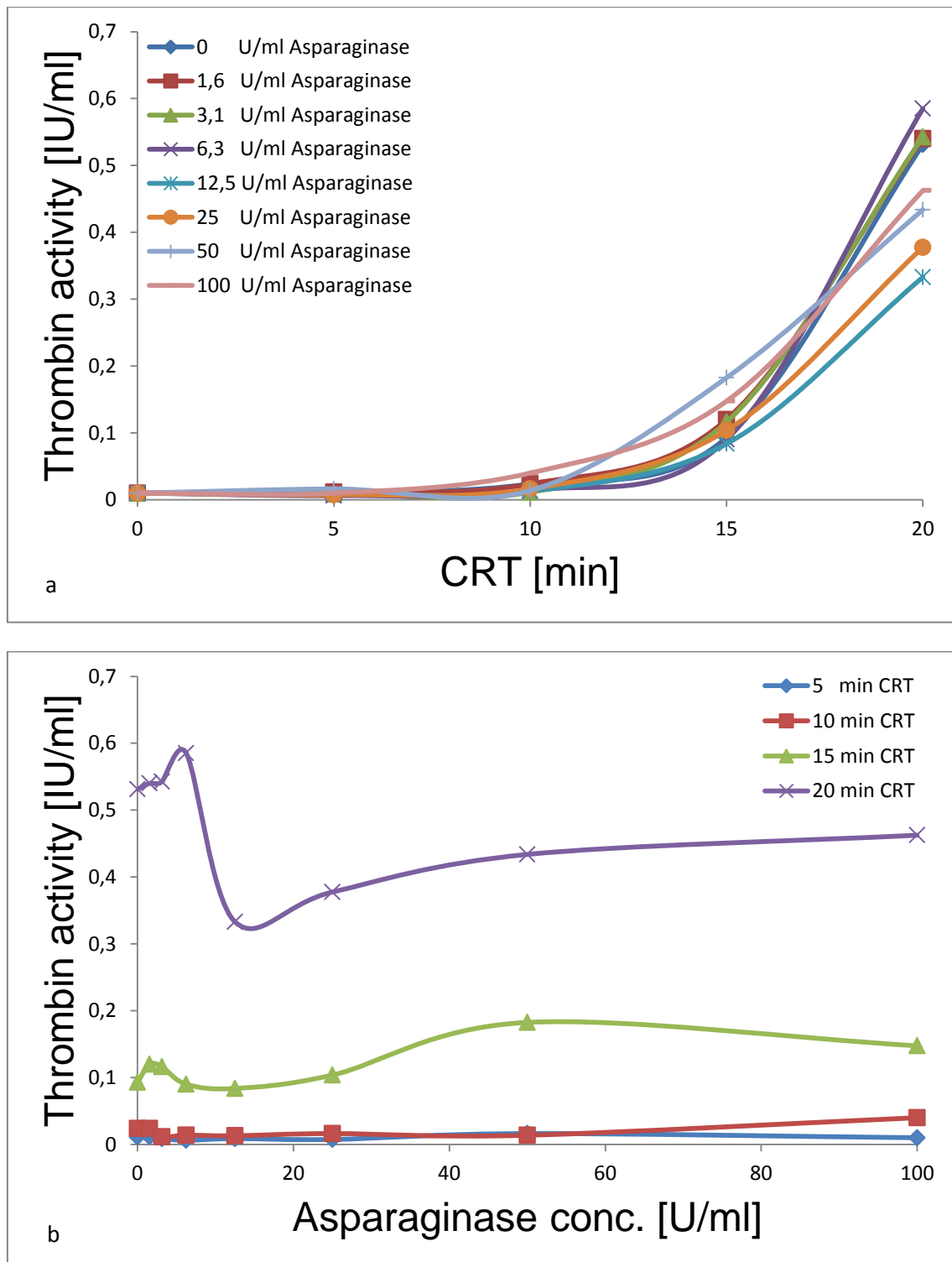


Abbildung 17: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 50 U/ml Asparaginase.

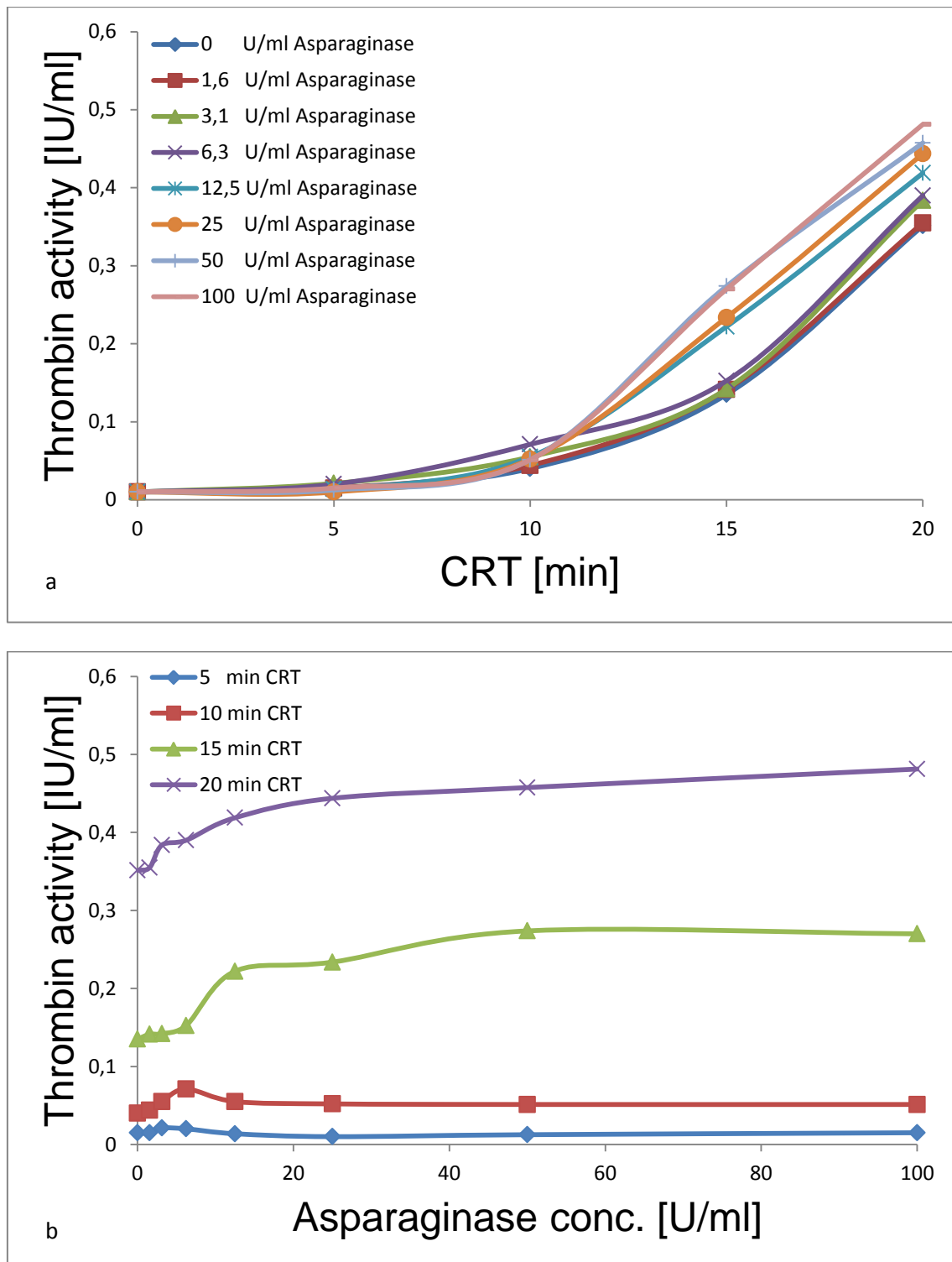


Abbildung 18: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 50 U/ml Asparaginase.

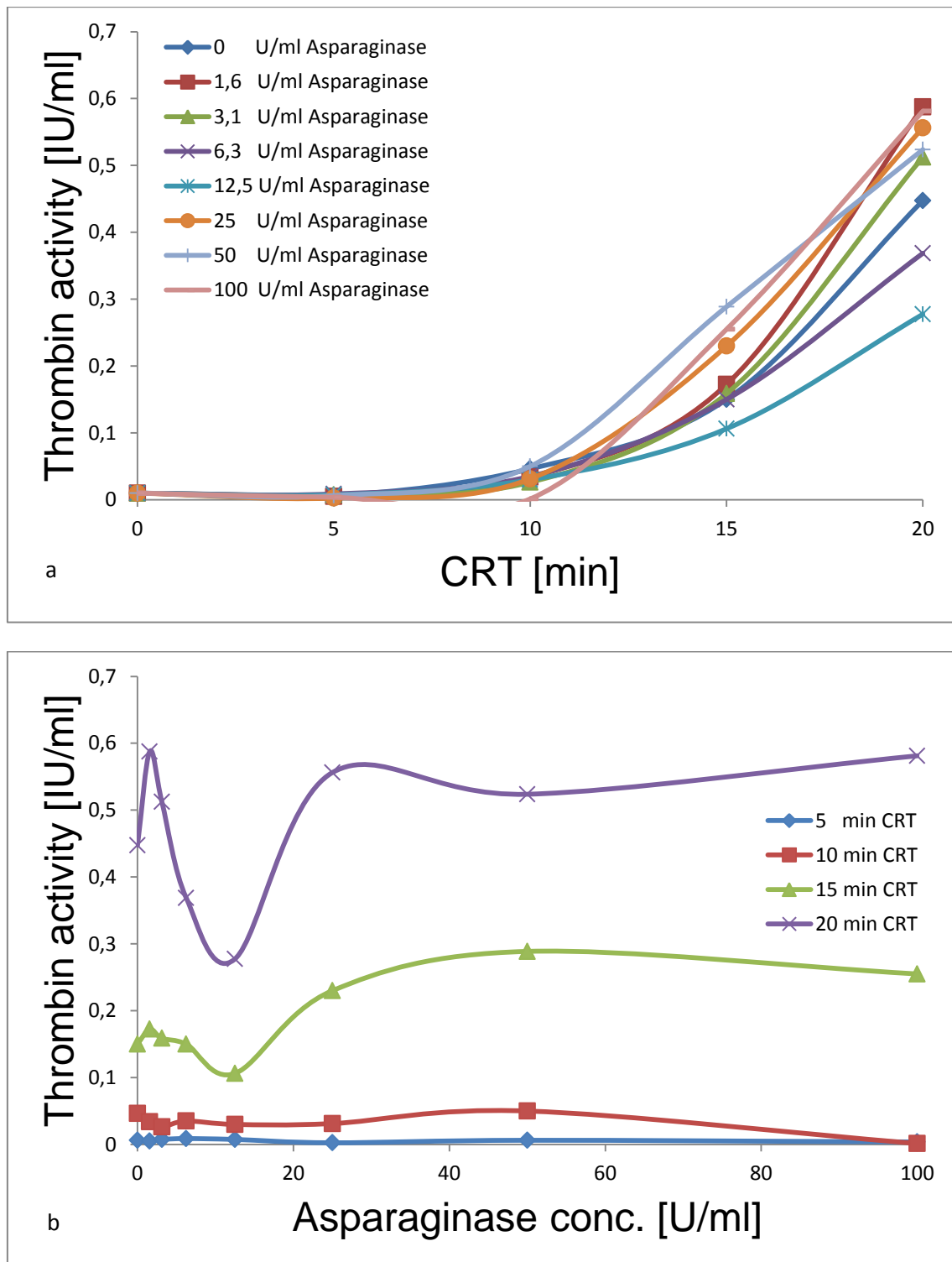


Abbildung 19: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 50 U/ml Asparaginase.

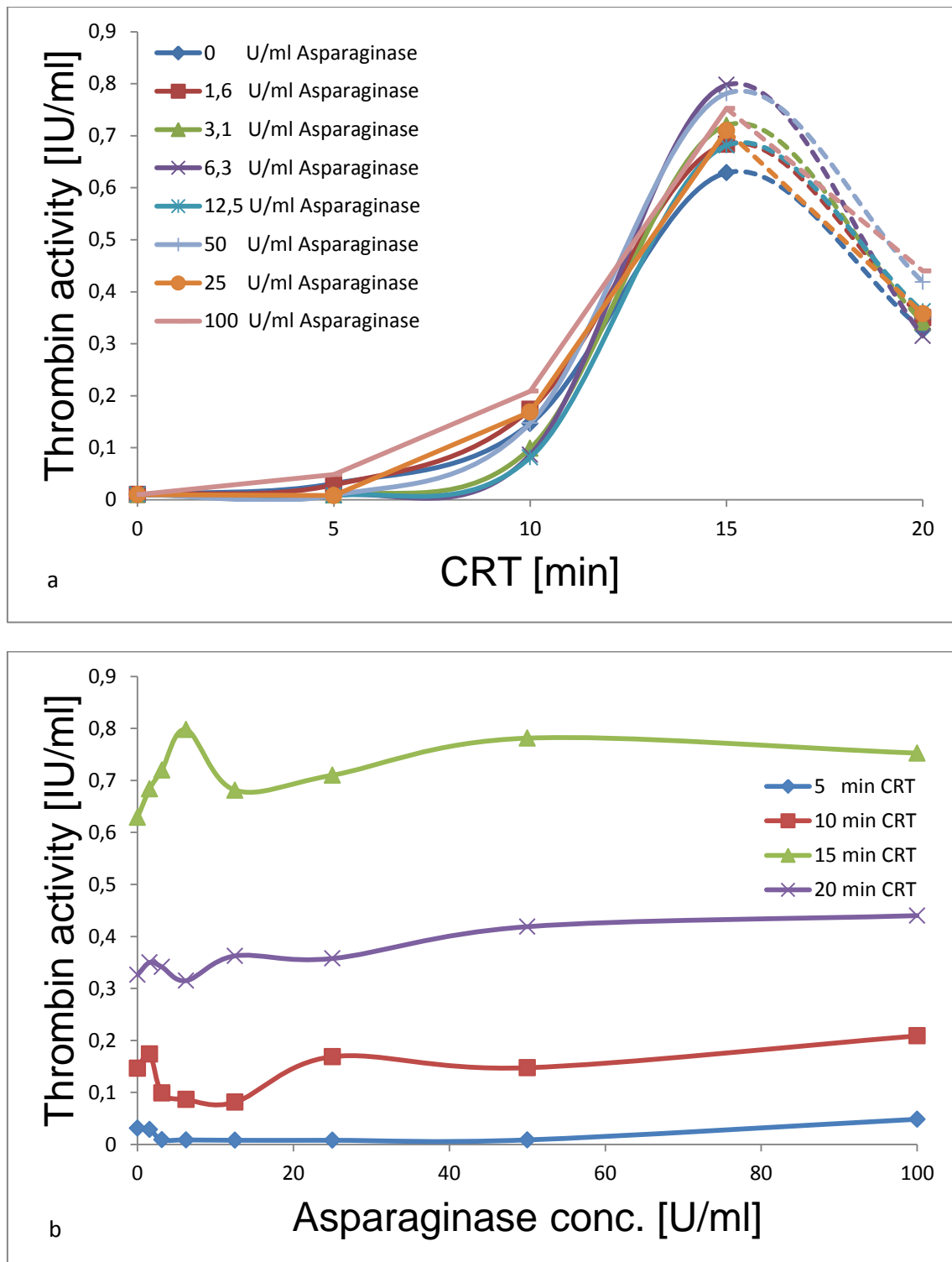


Abbildung 20: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 100 U/ml Asparaginase. Der (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht-valide Teil der Kurven in Abb. 20a wurde gestrichelt.

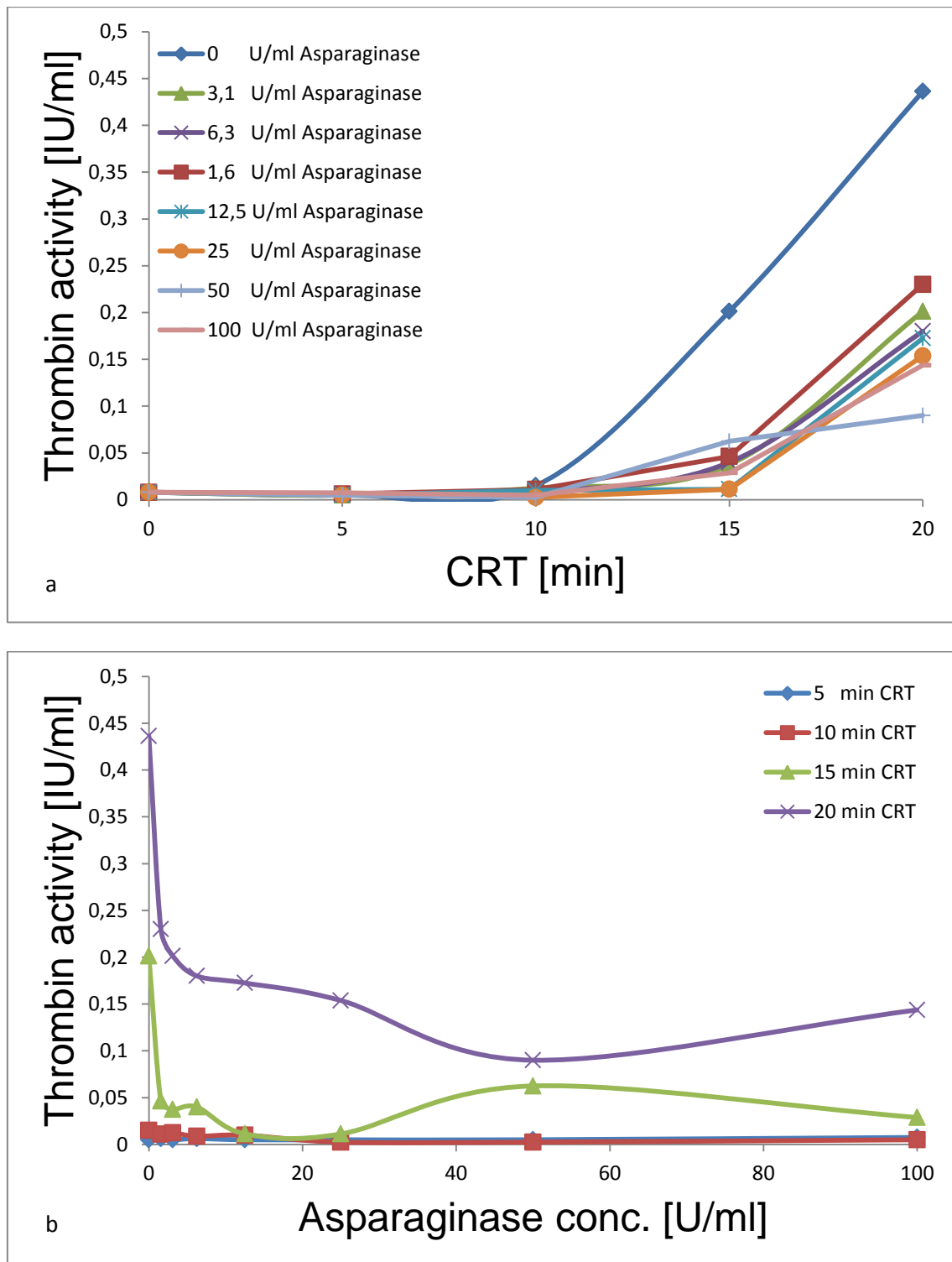


Abbildung 21: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. IC₅₀ lag bei 1 U/ml Asparaginase.

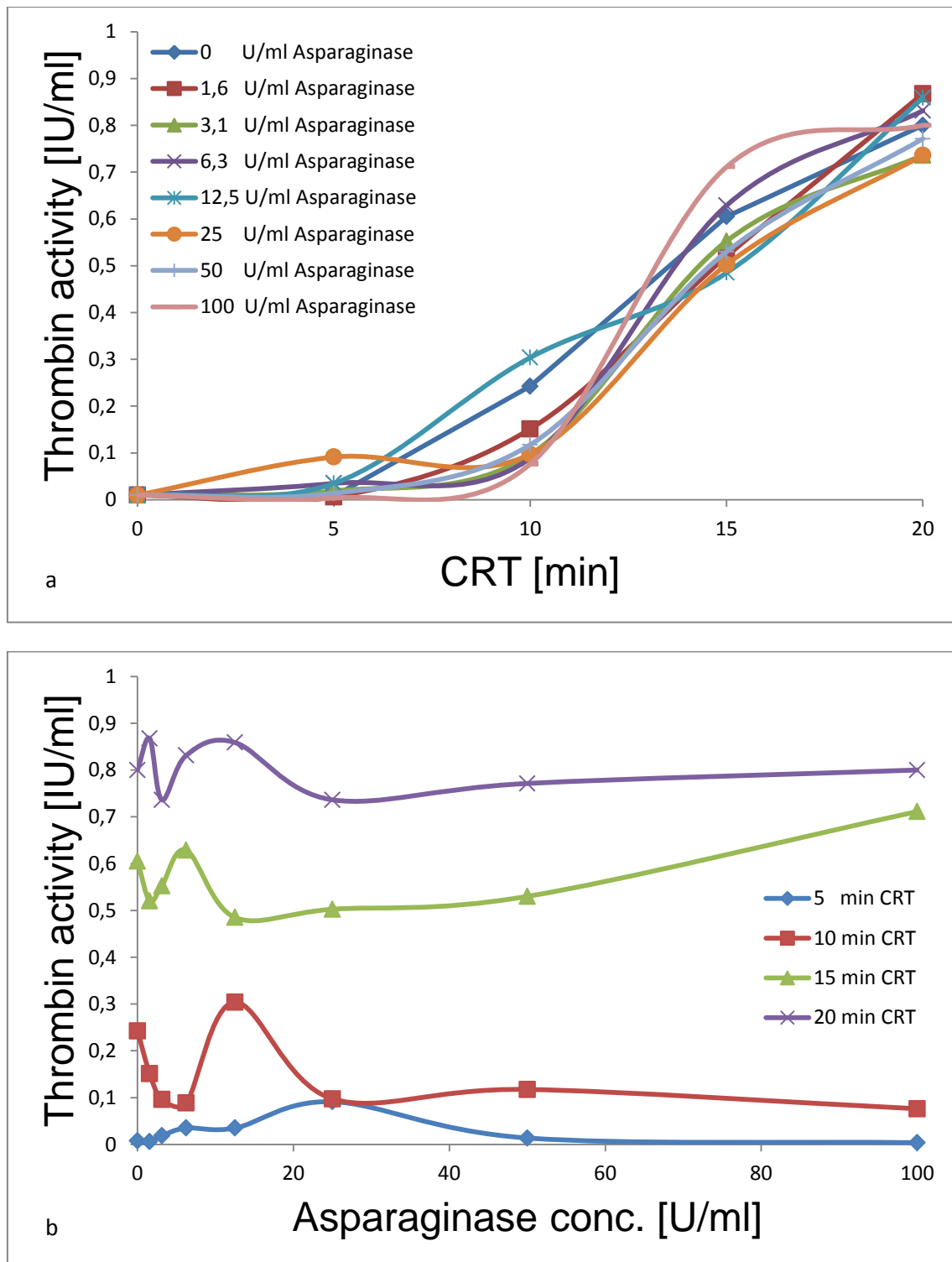


Abbildung 22: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. IC₅₀ lag bei 2 U/ml Asparaginase.

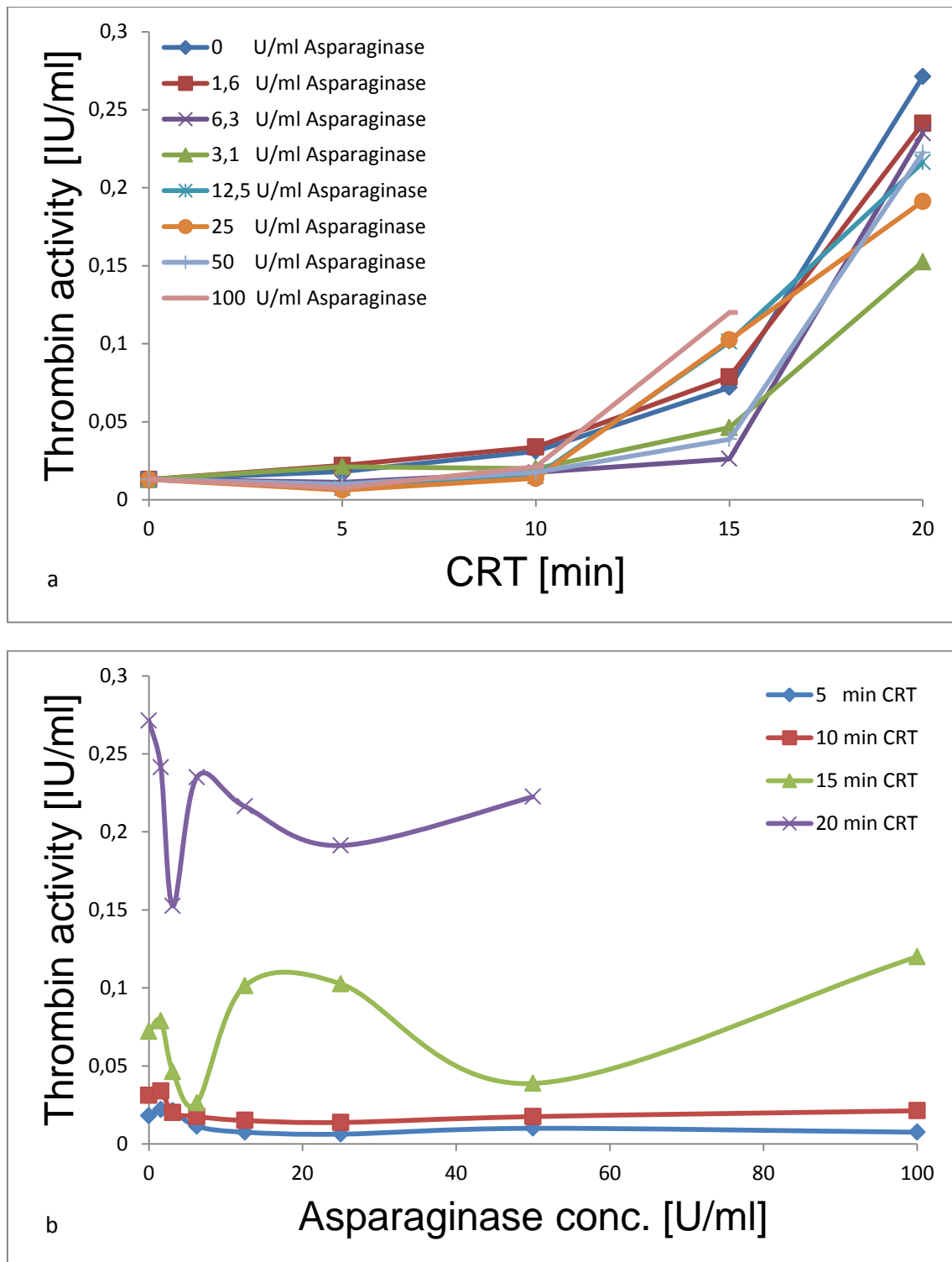


Abbildung 23: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 µl normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. IC₅₀ lag bei 5 U/ml Asparaginase. Der (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht-valide Teil der Kurven wurde weggelassen.

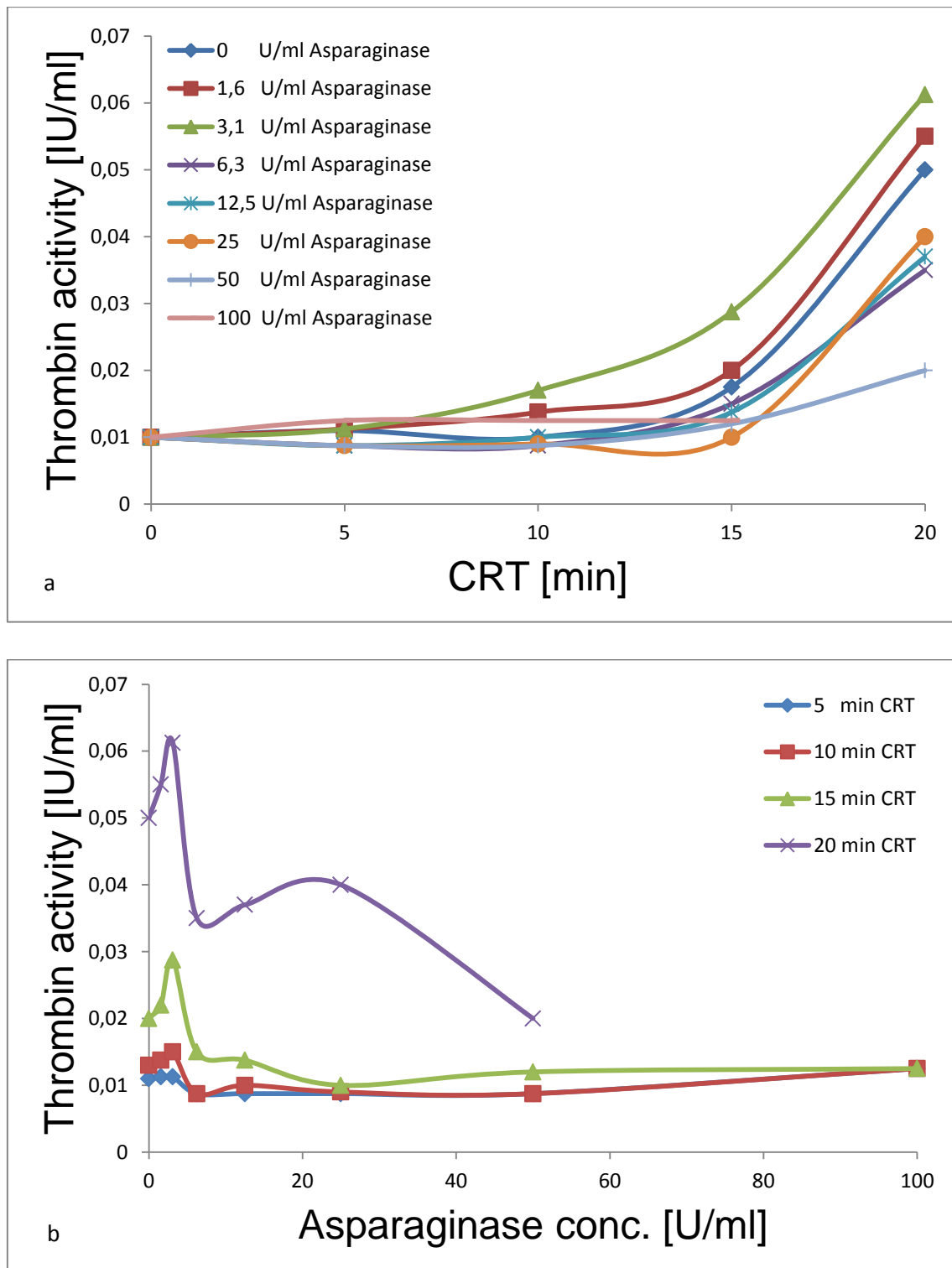


Abbildung 24: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. IC₅₀ lag bei 6 U/ml Asparaginase. Der (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht-valide Teil der Kurven wurde weggelassen.

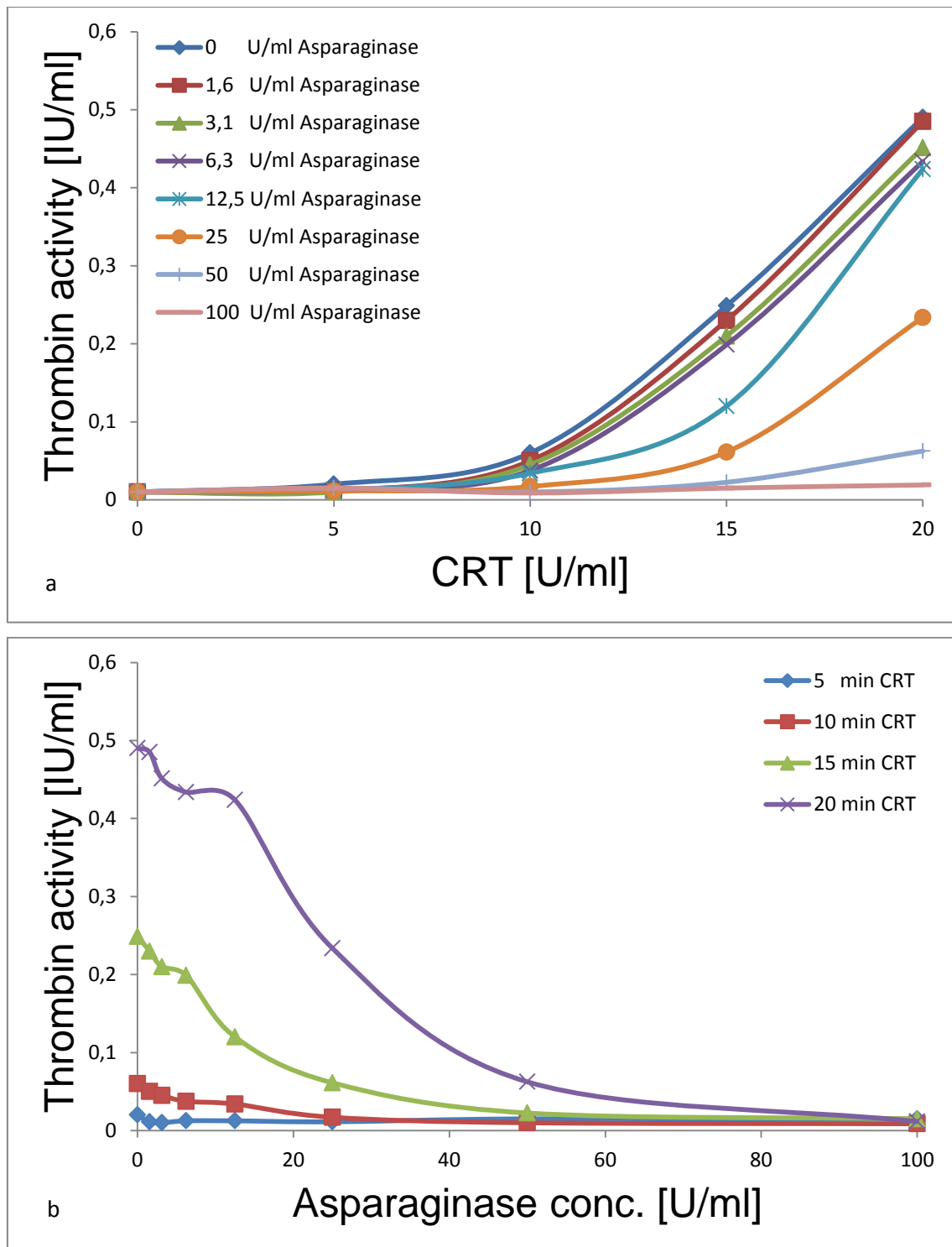


Abbildung 25: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. IC₅₀ lag bei 13 U/ml Asparaginase.

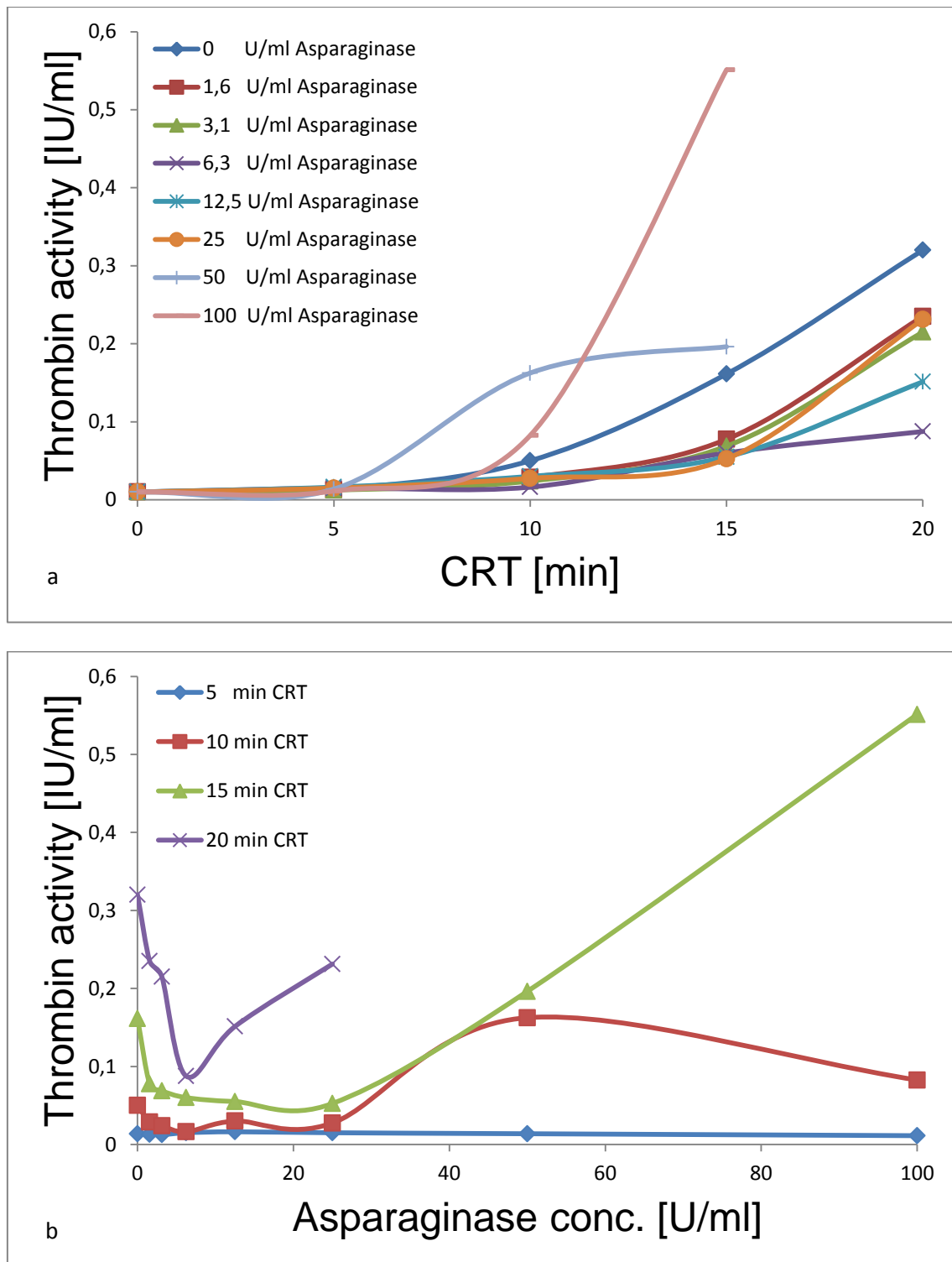


Abbildung 26: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. IC₅₀ lag bei 2 U/ml Asparaginase, die approx. SC₂₀₀ bei 38 U/ml Asparaginase. Der (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht-valide Teil der Kurven wurde weggelassen.

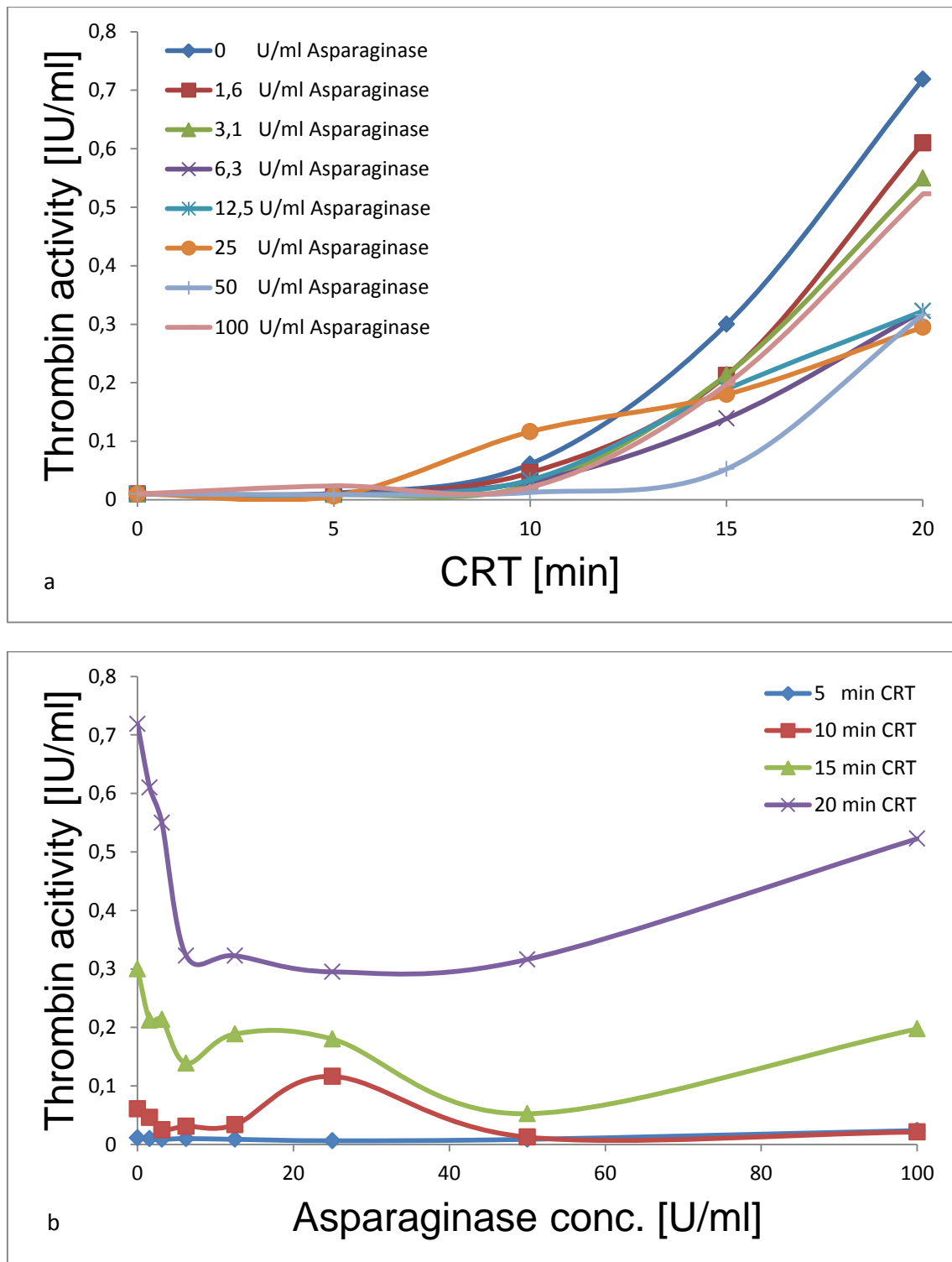


Abbildung 27: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. IC₅₀ lag bei 6 U/ml, die approx. SC₂₀₀ bei 25 U/ml Asparaginase.

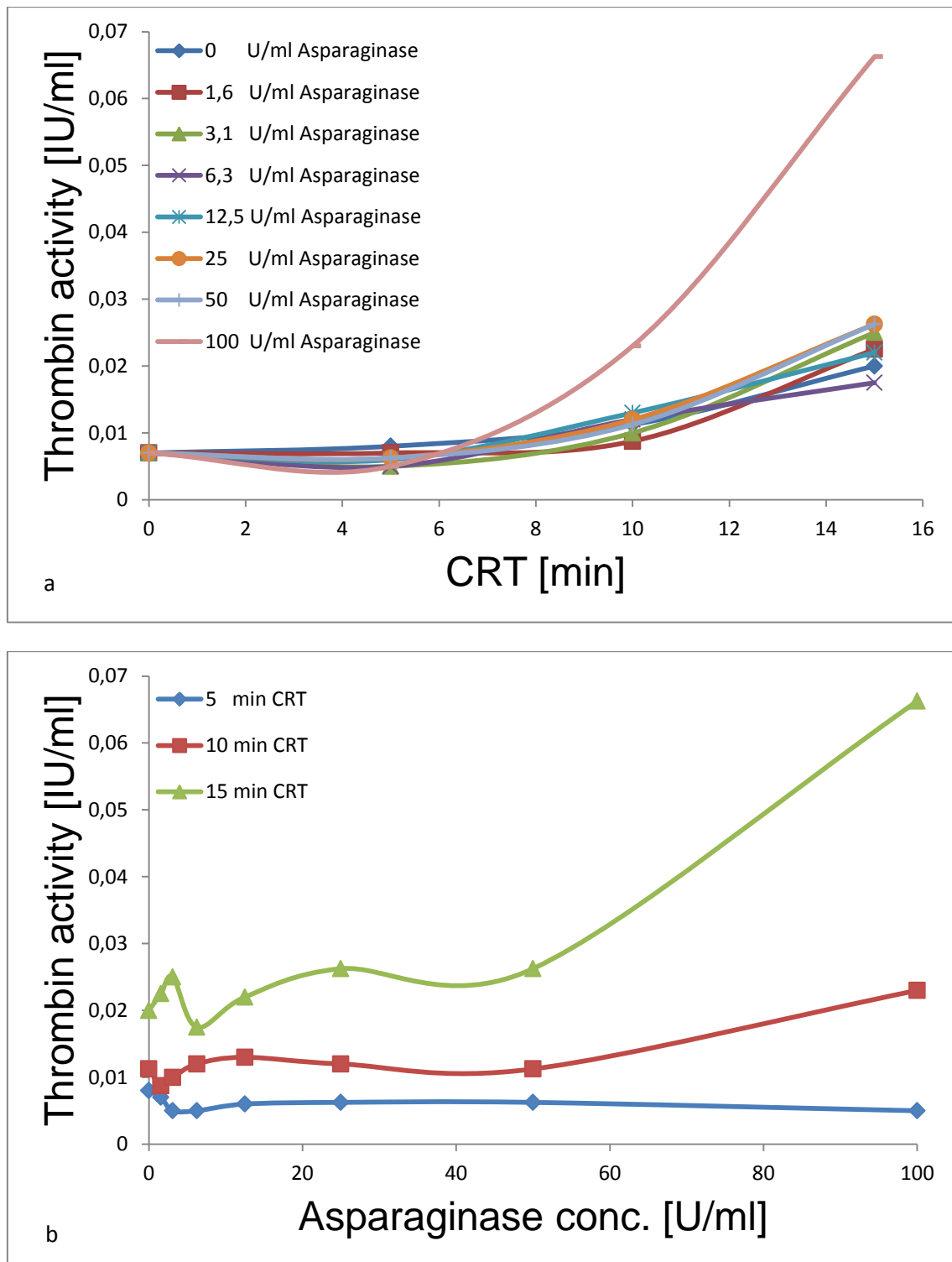


Abbildung 28: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 15 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. IC₅₀ lag bei 6 U/ml, die approx. SC₂₀₀ bei 55 U/ml Asparaginase.

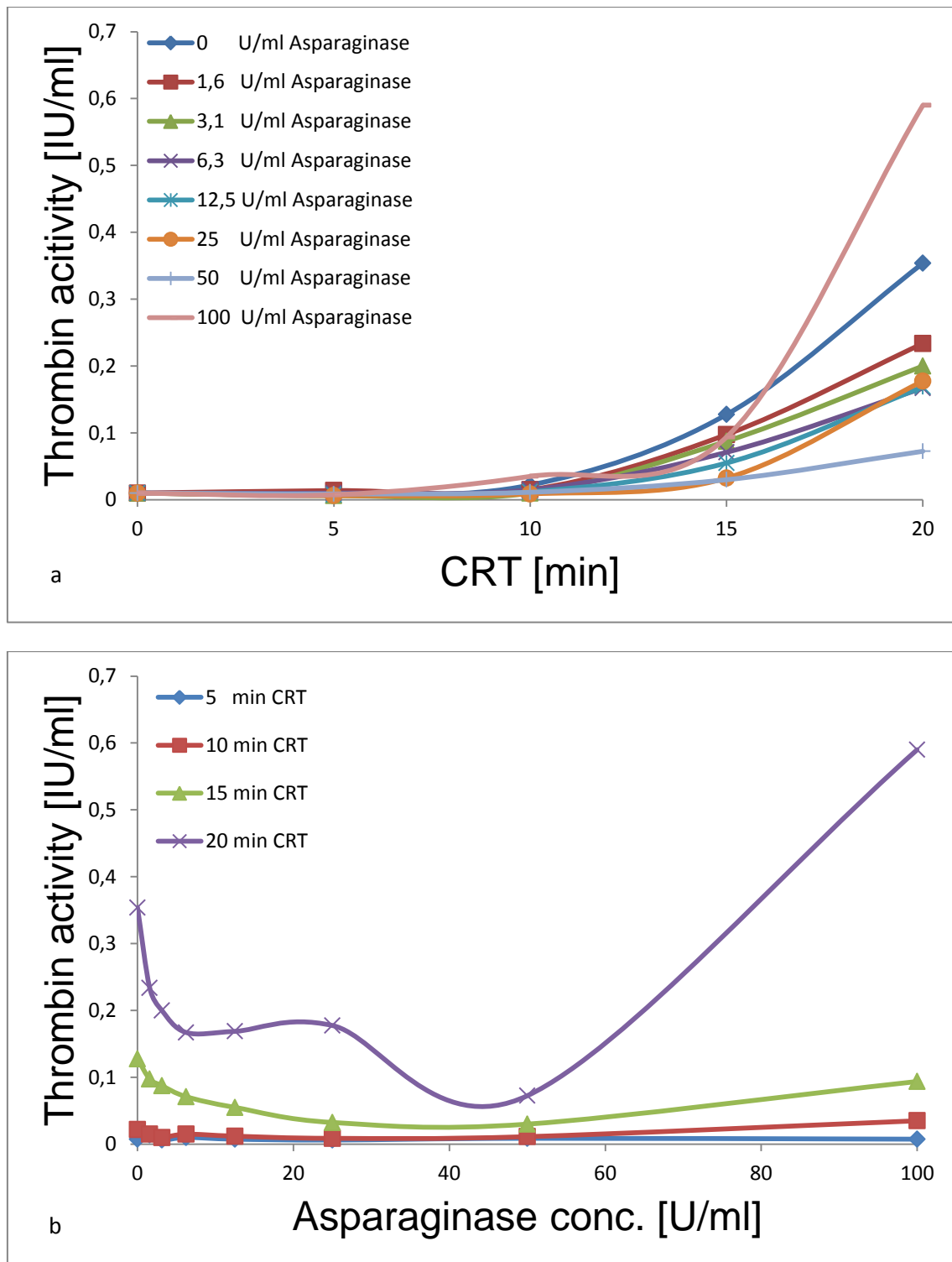


Abbildung 29: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 µl normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. IC50 lag bei 6 U/ml, die approx. SC200 bei 100 U/ml Asparaginase.

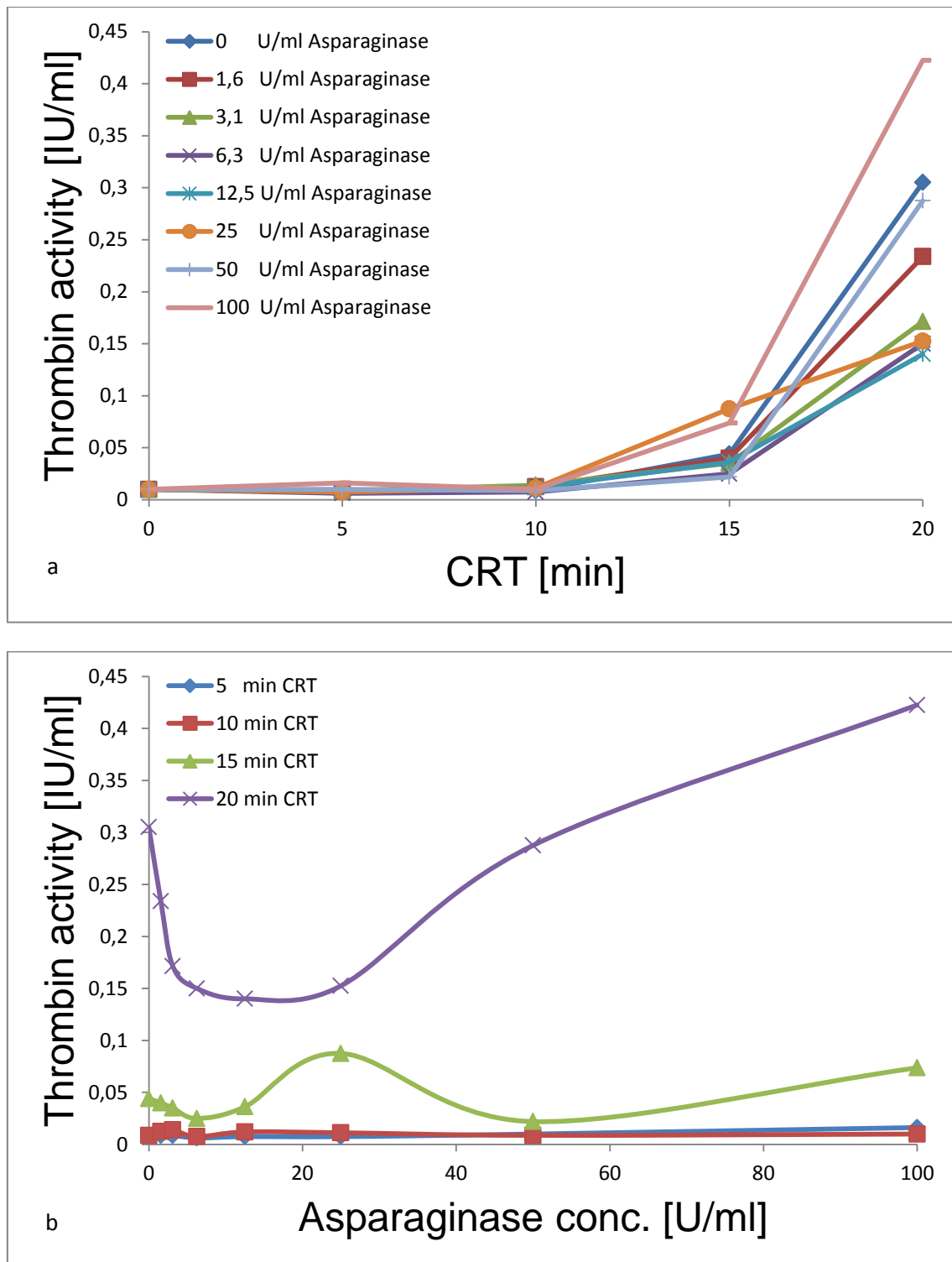


Abbildung 30: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 µl normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. IC₅₀ lag bei 6 U/ml, die approx. SC₂₀₀ bei 25 U/ml Asparaginase.

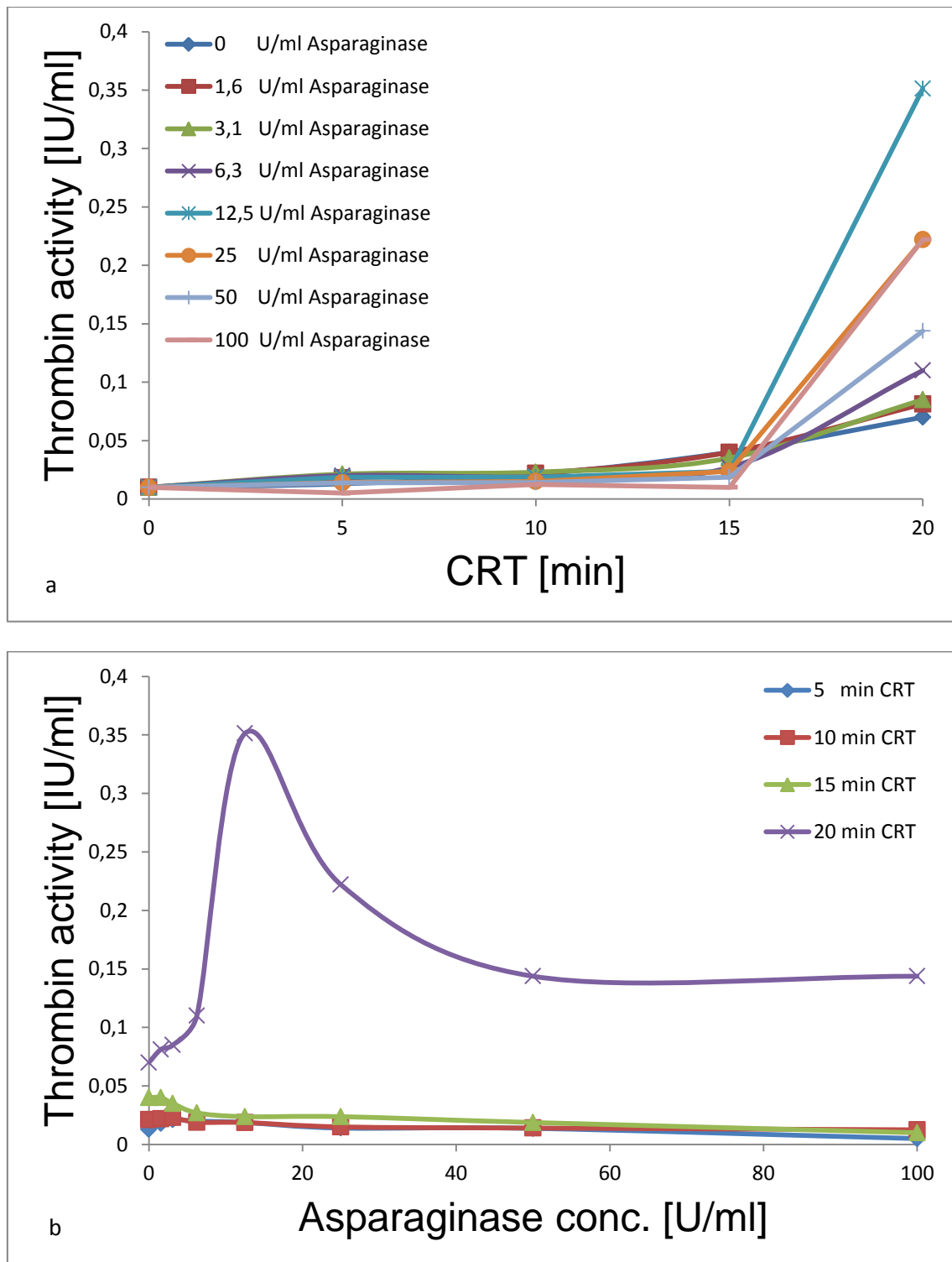


Abbildung 31: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. IC₅₀ lag bei 8 U/ml, die approx. SC₂₀₀ bei 8 U/ml Asparaginase.

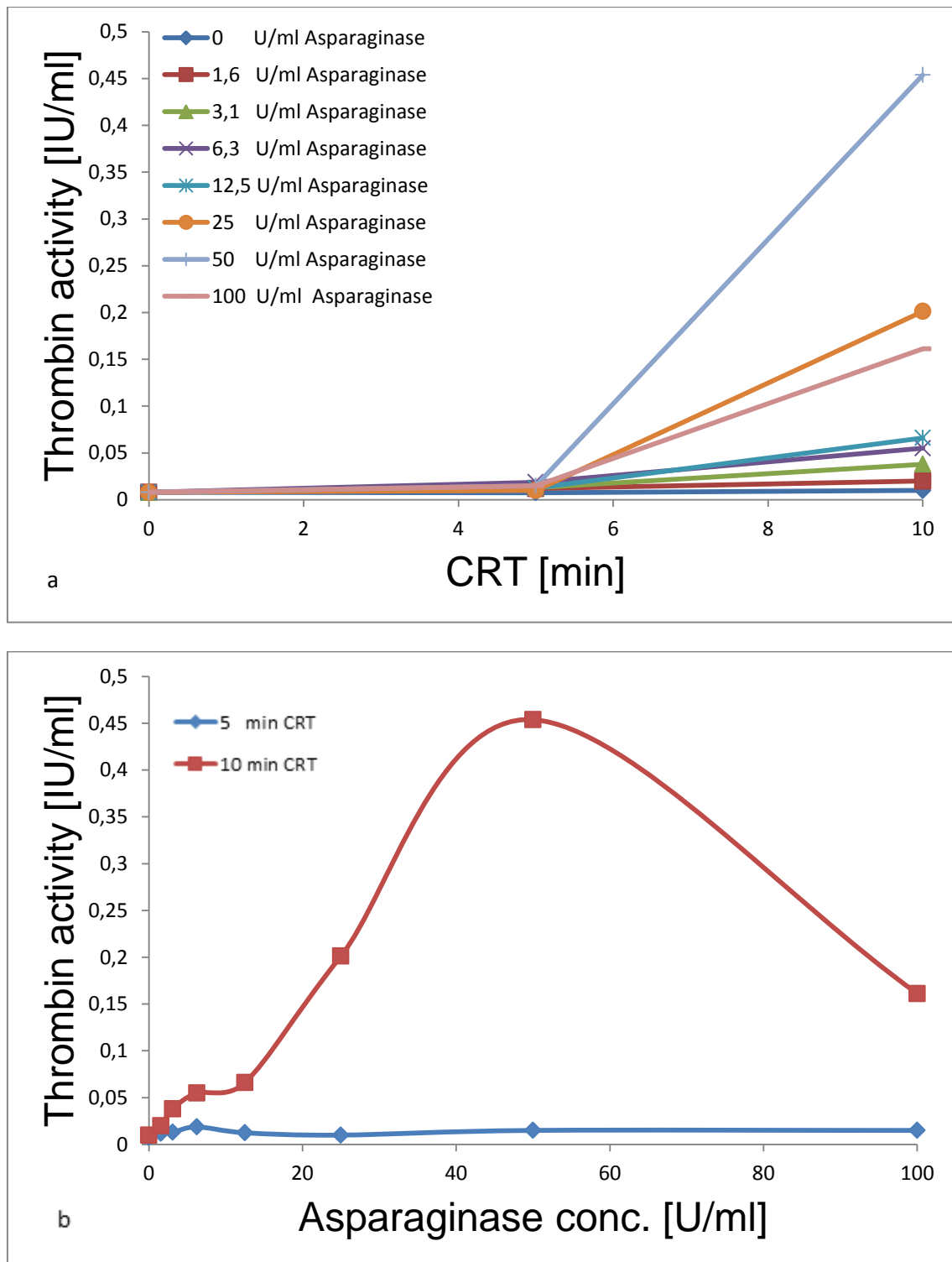


Abbildung 32: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 µl normales gepooltes Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 10 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 1 U/ml Asparaginase.

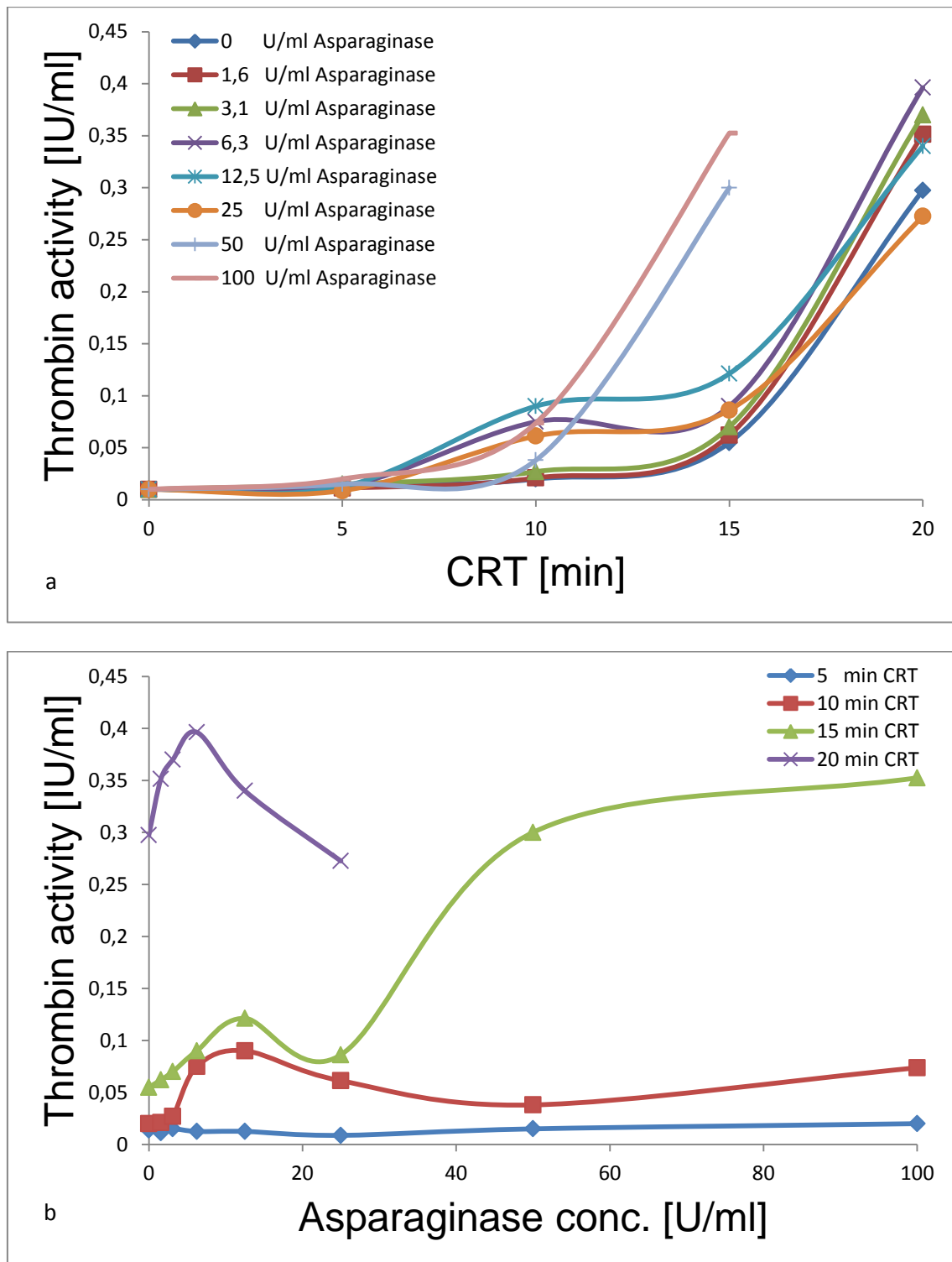


Abbildung 33: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 µl normales gepooltes Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 4 U/ml Asparaginase. Der (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht-valide Teil der Kurven wurde weggelassen.

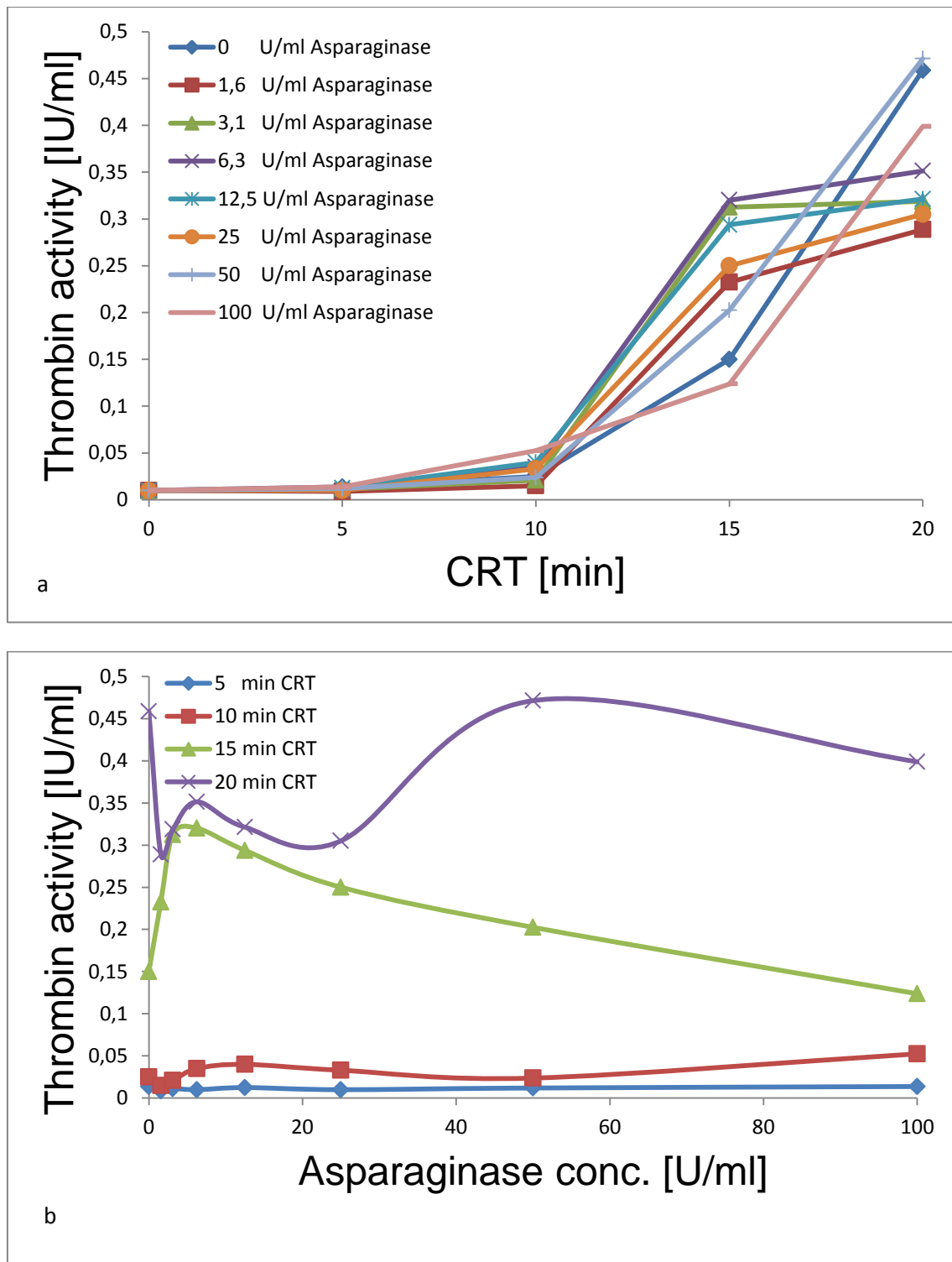


Abbildung 34: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 µl normales gepooltes Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 3 U/ml Asparaginase.

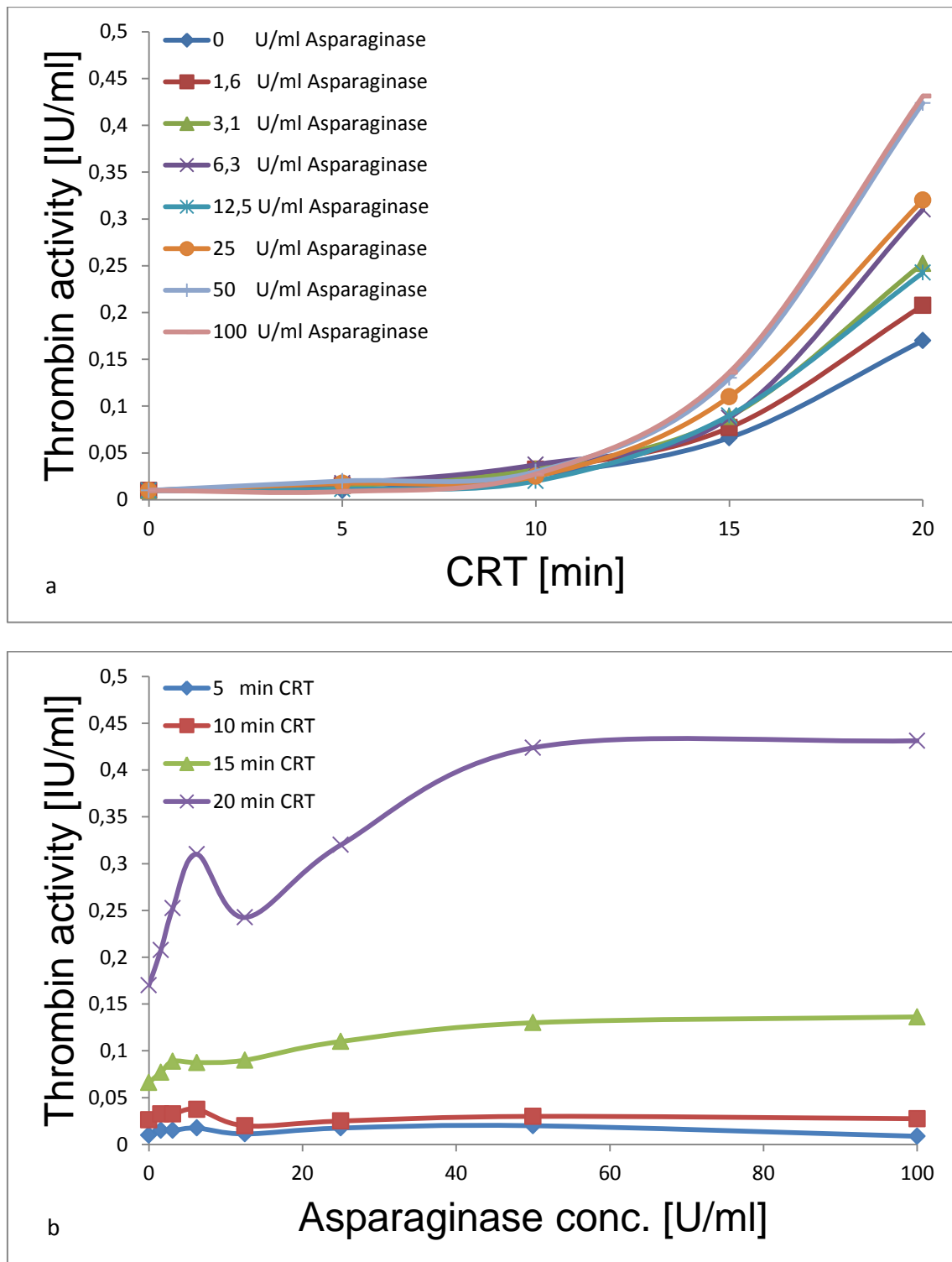


Abbildung 35: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 µl normales gepooltes Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 25 U/ml Asparaginase.

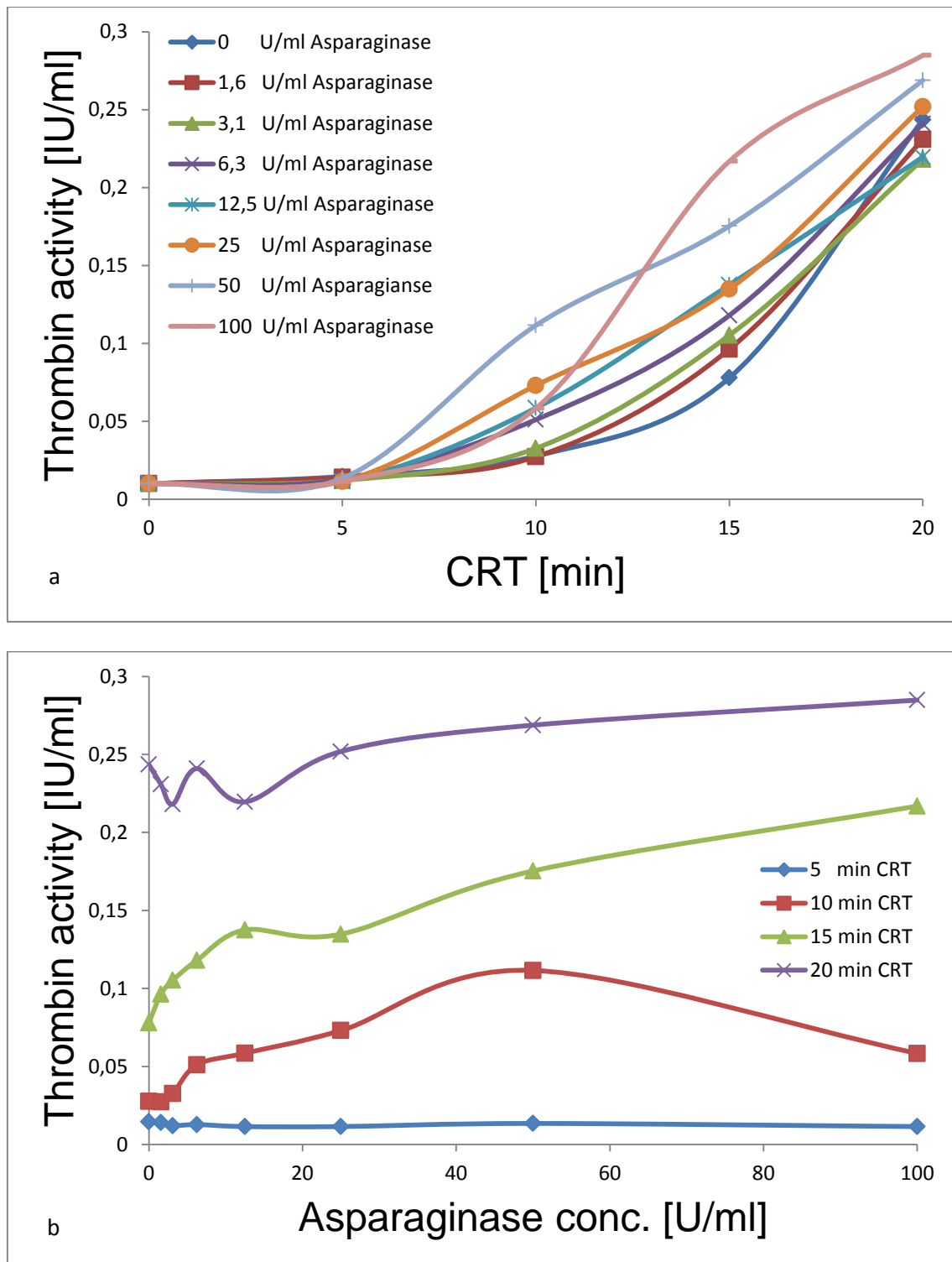


Abbildung 36: Durchschnittwert der Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration in Plasmapools

Es wurden die Durchschnittswerte von $n = 7$ Plasmapools berechnet. Die approx. SC200 lag bei 6 U/ml Asparaginase.

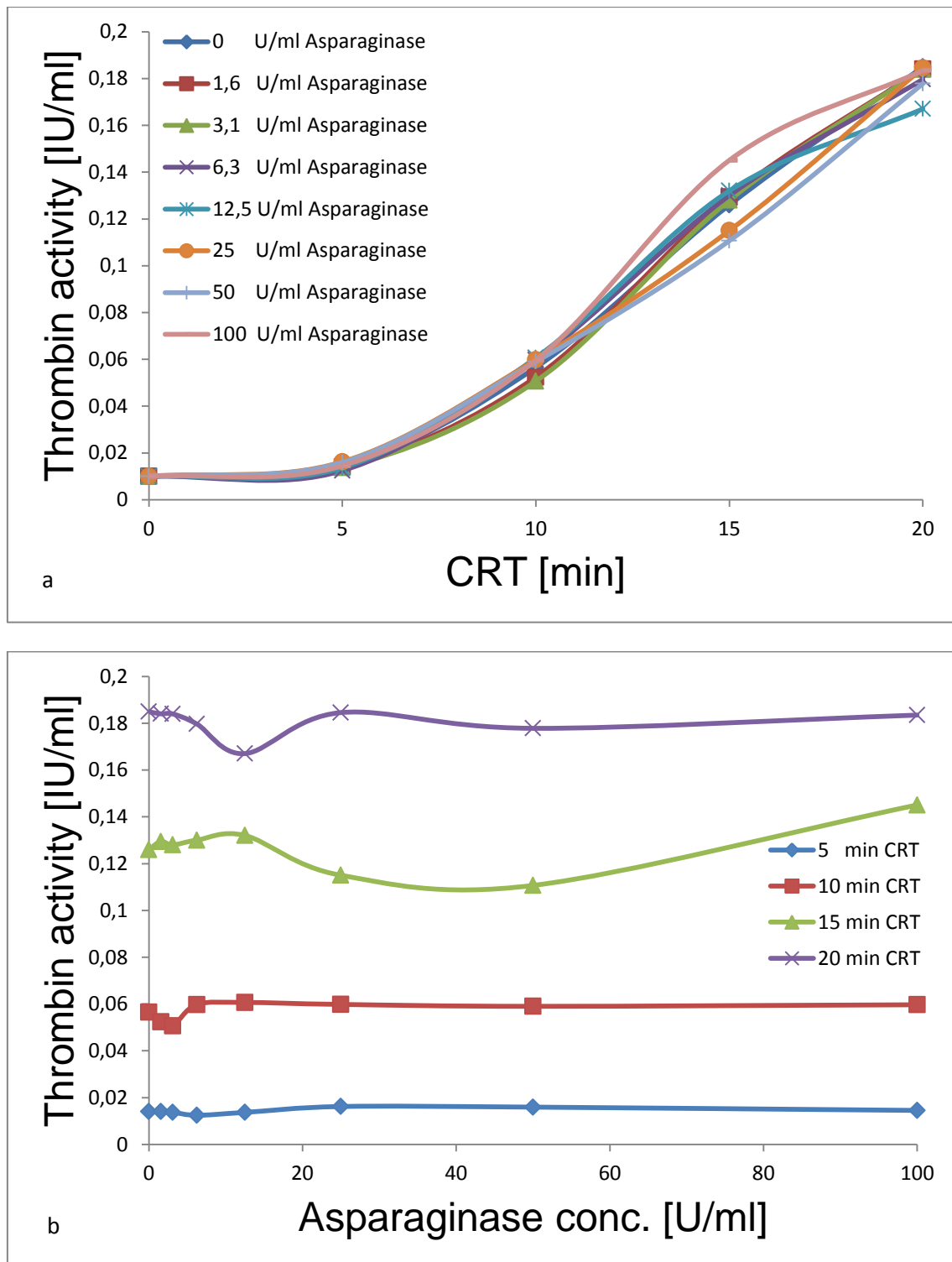


Abbildung 37: Durchschnittswerte der Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Es wurden die Durchschnittswerte von $n = 57$ Plasmaproben berechnet. Dabei ergab sich weder eine IC_{50} noch eine SC_{200} .

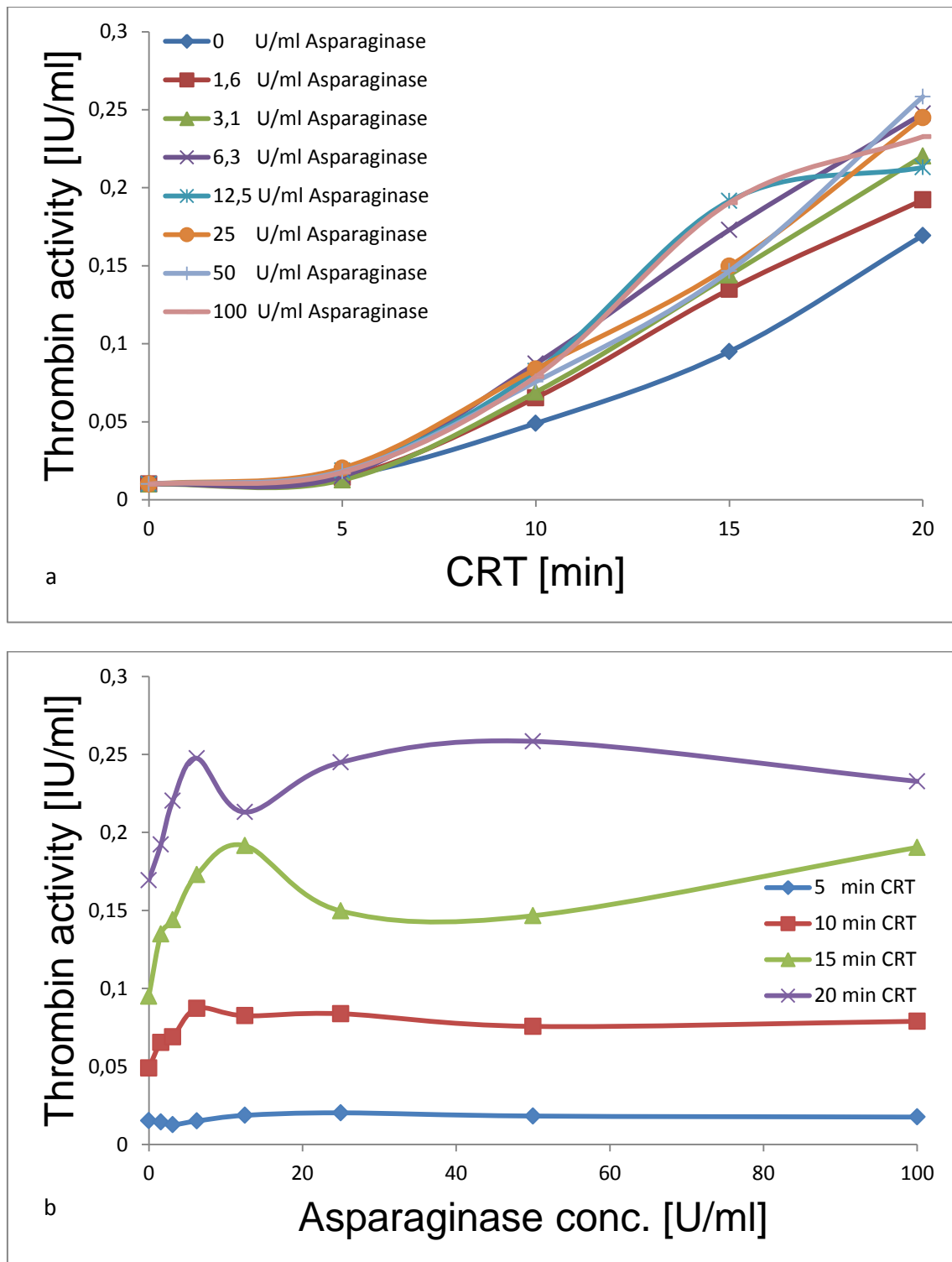


Abbildung 38: Durchschnittsthrombinaktivitäten aller Proben mit einer Asparaginase-SC200 in Abhängigkeit der Thrombinkonzentration

Es wurden die Durchschnittswerte aller Plasmen, die nur eine SC200 verfügten ($n = 29$), berechnet. Die approx. SC200 lag bei 6 U/ml.

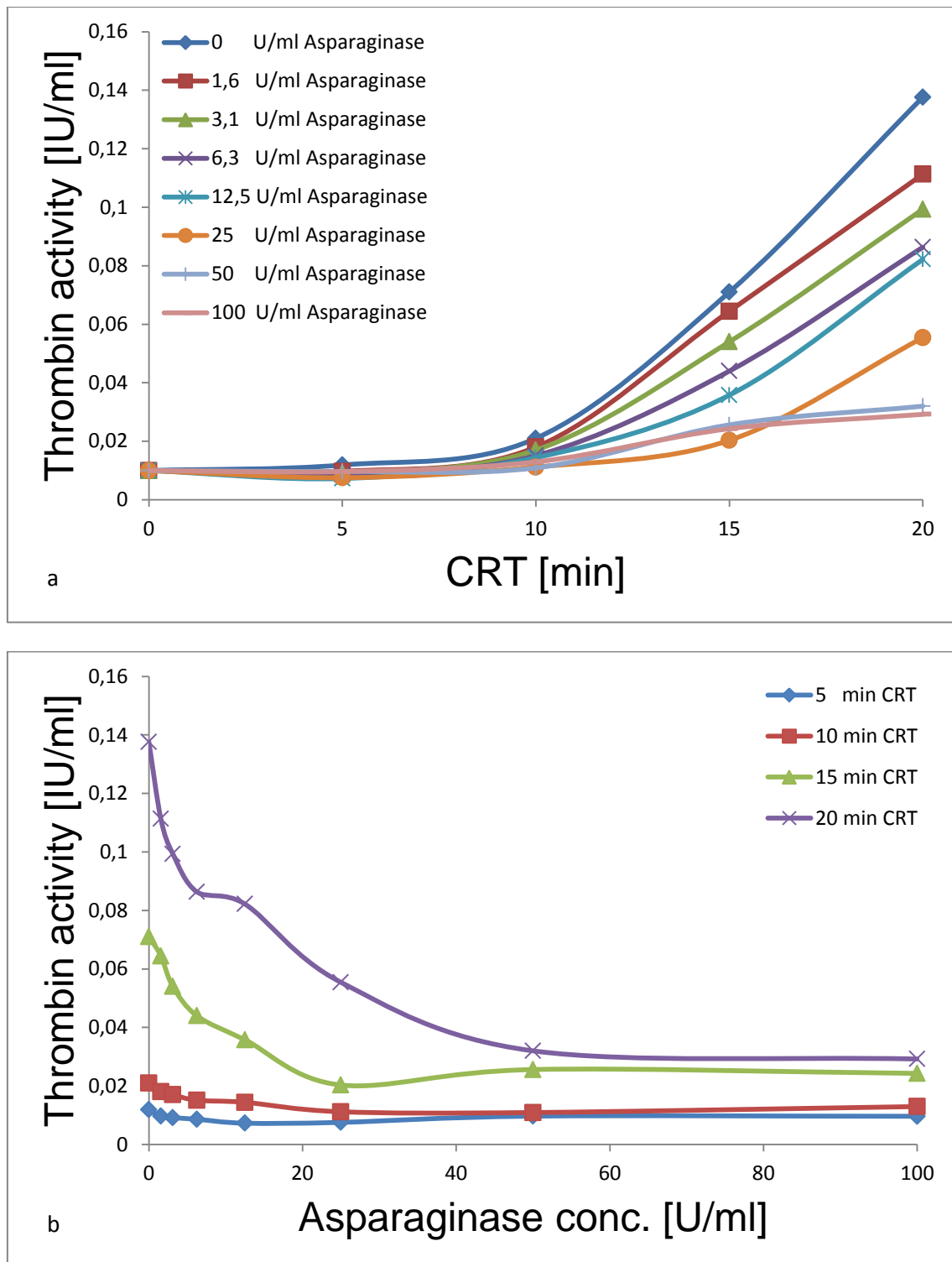


Abbildung 39: Durchschnittsthrombinaktivitäten aller Proben mit einer Asparaginase-IC50 in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Es wurden die Durchschnittswerte aller Plasmen, die nur eine IC50 verfügten (n = 12), berechnet. Die approx. IC50 lag bei 6 U/ml.

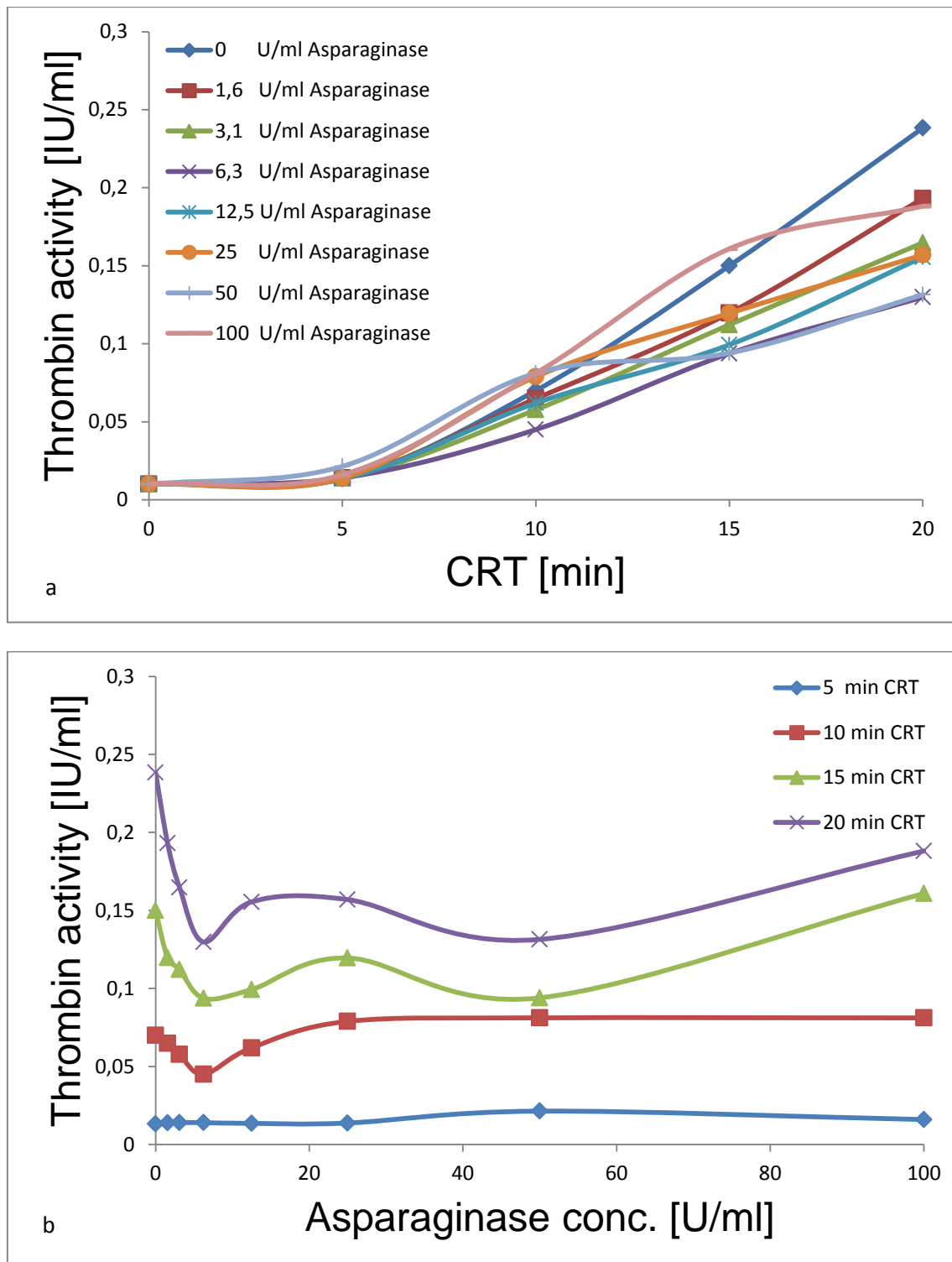


Abbildung 40: Durchschnittsthrombinaktivitäten aller Proben mit einer Asparaginase-IC50 und -SC200 in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Es wurden die Durchschnittswerte aller Plasmen, die sowohl eine IC50 als auch eine SC200 verfügten (n = 14), berechnet. Die approx. IC50 lag bei 4 U/ml, die approx. SC200 bei 40 U/ml Asparaginase.

4.2 RECA mit Plasmaproben unter Zugabe von nativer *E. coli* Asparaginase gleicher Produktart, aber mit unterschiedlichem Herstellungsdatum (alte Charge)

Im zweiten Versuchsteil wurden insgesamt 46 Plasmaproben, drei daraus hergestellte Pools und ein Frischplasma nach Zugabe von nativer *E. coli* Asnase analysiert. Zum Vergleich der beiden nativen Asparaginasen der gleichen Produktart, die sich lediglich im Herstellungsdatum unterschieden, wurde das Frischplasma mit der nativen Asparaginase aus diesem und der Asparaginase aus dem ersten Versuchsteil versetzt. Tabelle 5 fasst die Ergebnisse der 46 Plasmaproben, die mit der alten Charge behandelt wurden, zusammen.

Proben-anzahl	Approx. SC200-Wertespanne	Approx. SC200-Durchschnittswert	Approx. SC200-Standardabweichung
46	1 - 25 U/ml	5,8 U/ml	5,4 U/ml

Tabelle 5: Ergebnisse der alten Charge Asparaginase nach Zusatz zu 46 individuellen Plasmaproben

Die durchschnittliche approximative SC200 von der alten Charge der *E. coli* Asparaginase für die plasmatische Thrombin-Generierung von 46 individuellen Plasmaproben lag bei $5,8 \pm 5,4$ U/ml (Mittelwert \pm 1 Standardabweichung). Die Plasmen verfügten insgesamt über eine Wertespanne von 1 bis 25 U/ml Asparaginase für die approx. SC200. Nur eines von 46 Plasmen (2,2 %) zeigte gleichzeitig sowohl eine approx. SC200 von ungefähr 16 U/ml und eine approx. IC50 von 3 U/ml Asparaginase (Abb. 53). Für keines der Plasmen konnte ausschließlich nur eine IC50 ermittelt werden. Die drei hergestellten Pools hatten eine approximative SC200 von 2 - 6 U/ml (Abb. 55-57).

Abb. 41-59 zeigen, dass die zum Citratplasma zugesetzte Asparaginase die plasmatische Blutgerinnung modifiziert.

Von den insgesamt 46 Plasmaproben hatten

- 12 (26 %) eine approx. SC200 < 2,1 U/ml (Abb. 41-43)
- 12 (26 %) eine approx. SC200 von 2,1 - 3 U/ml (Abb. 44-46)
- 13 (28 %) eine approx. SC200 von 3,1 - 6 U/ml (Abb. 47-49)
- 9 (20 %) eine approx. SC200 von > 6 U/ml Asparaginase (Abb. 50-52).

Die Asparaginase ist folglich bei 80 % der Plasmen bereits bei Konzentrationen bis zu 6 U/ml prothrombotisch.

Da nur eine von 46 Plasmaproben (Abb. 53) neben einer approx. SC200 von 16 U/ml eine approx. IC50 von 3 U/ml aufwies, lässt sich deutlich erkennen, dass diese Charge Asparaginase einen signifikanten prothrombogenen Effekt hat.

Die durchschnittliche SC200 aller Thrombinaktivitäten in diesen Plasmaproben lag bei 5 U/ml (Abb. 54).

Der Durchschnittswert der neuen Charge Asparaginase für die SC200, basierend auf den Proben, die nur eine SC200 aufwiesen, erzielte einen Wert von 6 U/ml (siehe Abb. 38). Der Durchschnittswert der neuen Charge für Proben, die nur einen IC50-Wert zeigten, lag ebenfalls bei 6 U/ml (siehe Abb. 39). Das heißt, dass die neue Charge Asparaginase, was die Asparaginasekonzentrierung im Vergleich zu alten Charge angeht, nicht so thrombogen ist.

Die drei verschiedenen Pools hatten eine Spannbreite der SC200 von 2 - 6 U/ml (Abb. 55-57).

Das Frischplasma wurde mit den beiden Asparaginasetypen aus Versuchsteil eins (neue Charge) und zwei (alte Charge) vergleichend behandelt. Abb. 58 und 59 zeigen die unterschiedlichen Auswirkungen der alten (Abb. 58) und neuen Charge (Abb. 59) auf das Frischplasma.

Tabelle 6 auf der nächsten Seite fasst die Ergebnisse der beiden nativen Asparaginasen auf das Frischplasma mit den dazugehörigen IC50- und SC200-Werten zusammen.

Asparaginasepräparation	Approx. SC200	Approx. IC50
<i>E. coli</i> Asparaginase (alte Charge)	1 U/ml	--
<i>E. coli</i> Asparaginase (neue Charge)	5 U/ml	--

Tabelle 6: Ergebnisse der Frischplasmaprobe zugesetzt mit der alten und neuen Charge der nativen *E. coli* Asparaginase

Die alte Charge Asparaginase wies eine approx. SC200-Konzentration von 1 U/ml auf (Abb. 58), wohingegen die neue eine von 5 U/ml verfügte (Abb. 59). Das verdeutlicht, dass für dieses Individuum die alte Charge Asparaginase wesentlich prothrombogener wirkt als die neue.

Im Folgenden werden die Abbildungen von individuellen Plasmaproben nach Zusatz der Asparaginase in Bezug auf ihre Thrombin-Generierung gegenüber der CRT und der Asparaginasekonzentration gesammelt dargestellt.

Abb. 41-52 zeigen exemplarisch Plasmaproben mit unterschiedlichen approx. SC200-Werten. Dabei veranschaulichen Abb. 41-43 exemplarisch individuelle Plasmaproben, die eine approx. SC200 < 2,1 U/ml besitzen.

Abb. 44-46 stellen Thrombingenerierungskurven dar, die eine approx. SC200 von 2,1 - 3 U/ml haben.

Abb. 47-49 illustrieren Proben mit einem approx. SC200 von 3 - 6 U/ml.

Abb. 50-52 demonstrieren Thrombin-Generierungskurven mit einer approx. SC200 > 6 U/ml .

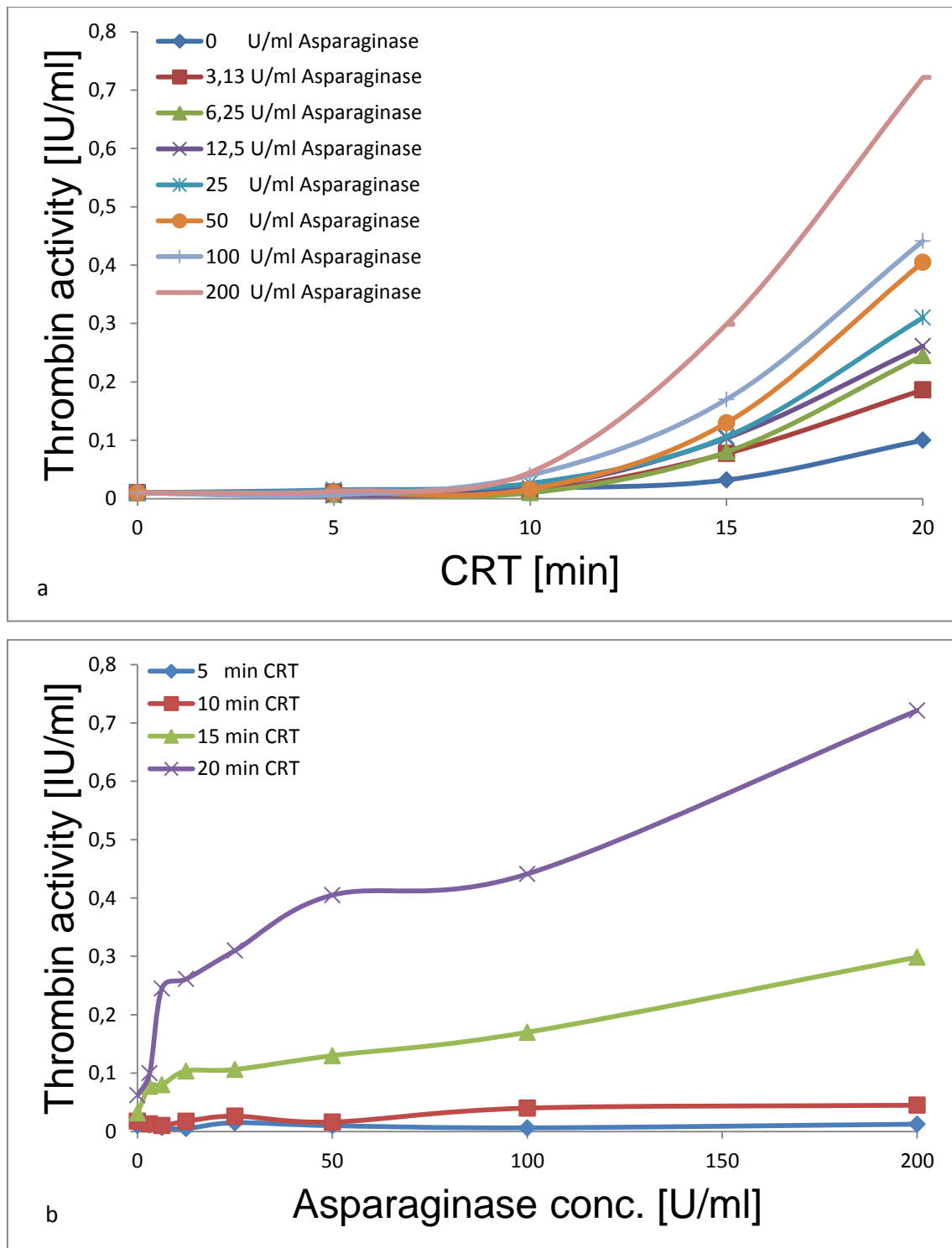


Abbildung 41: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 200 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 2 U/ml Asparaginase.

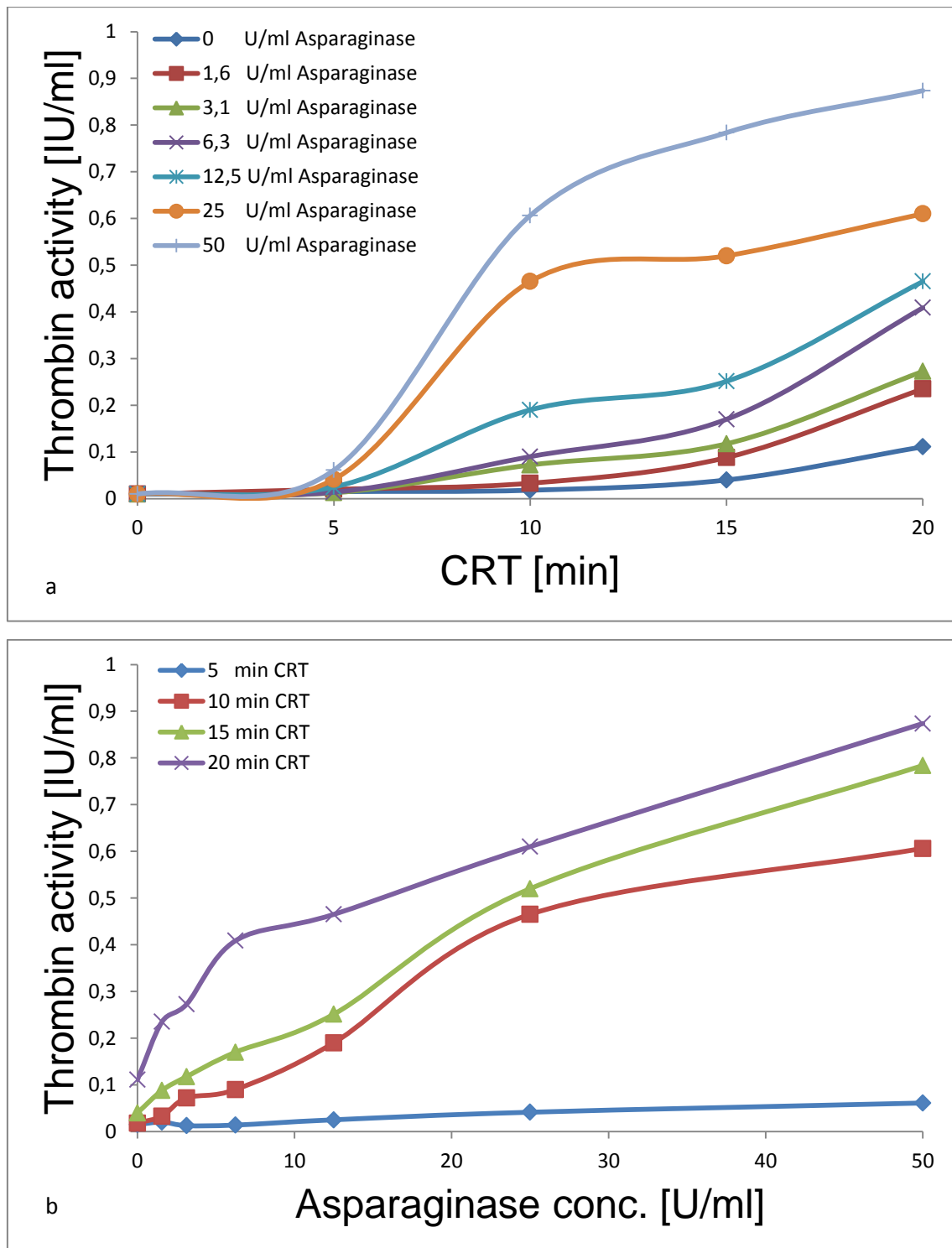


Abbildung 42: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 50 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 1 U/ml Asparaginase.

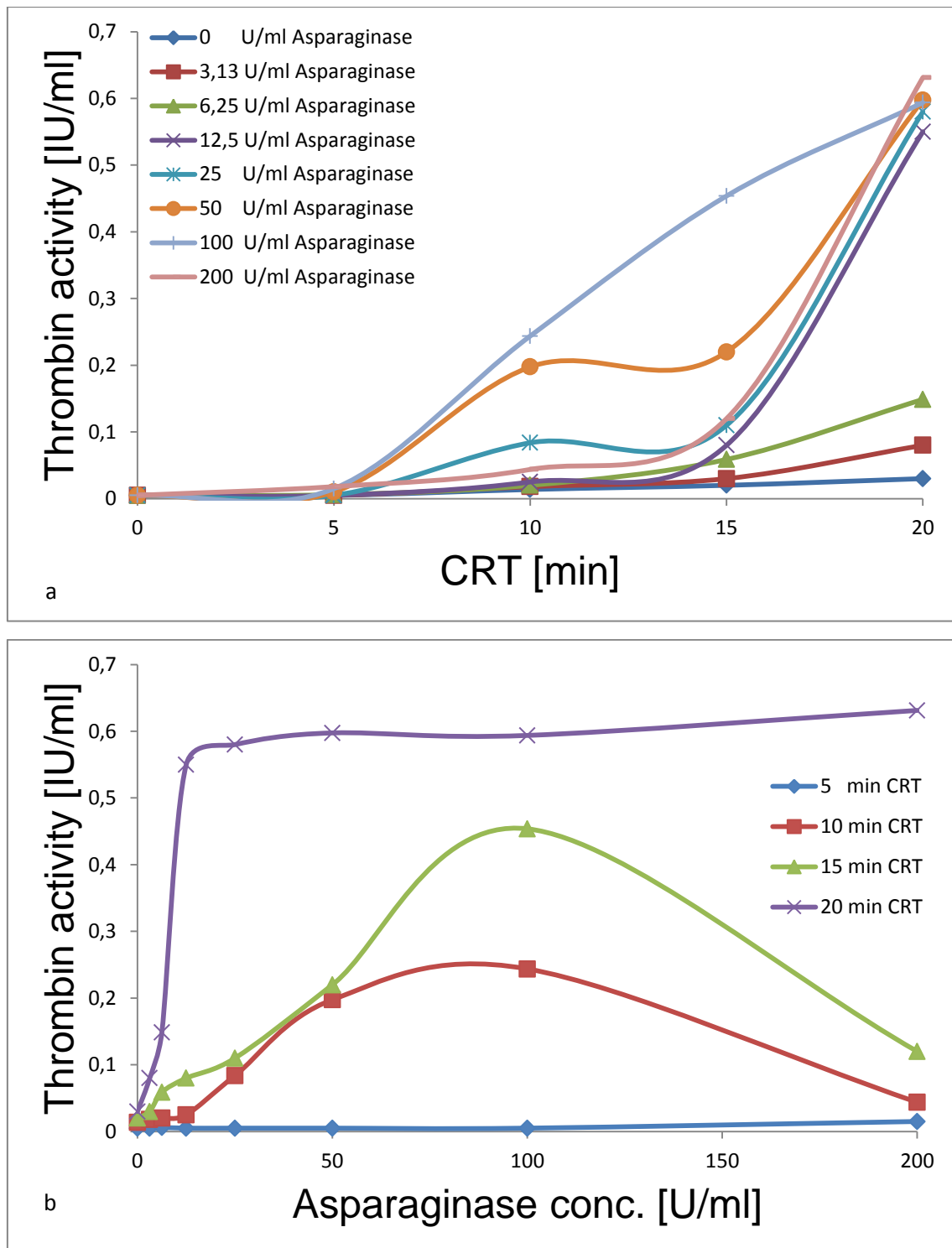


Abbildung 43: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 200 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 2 U/ml Asparaginase.

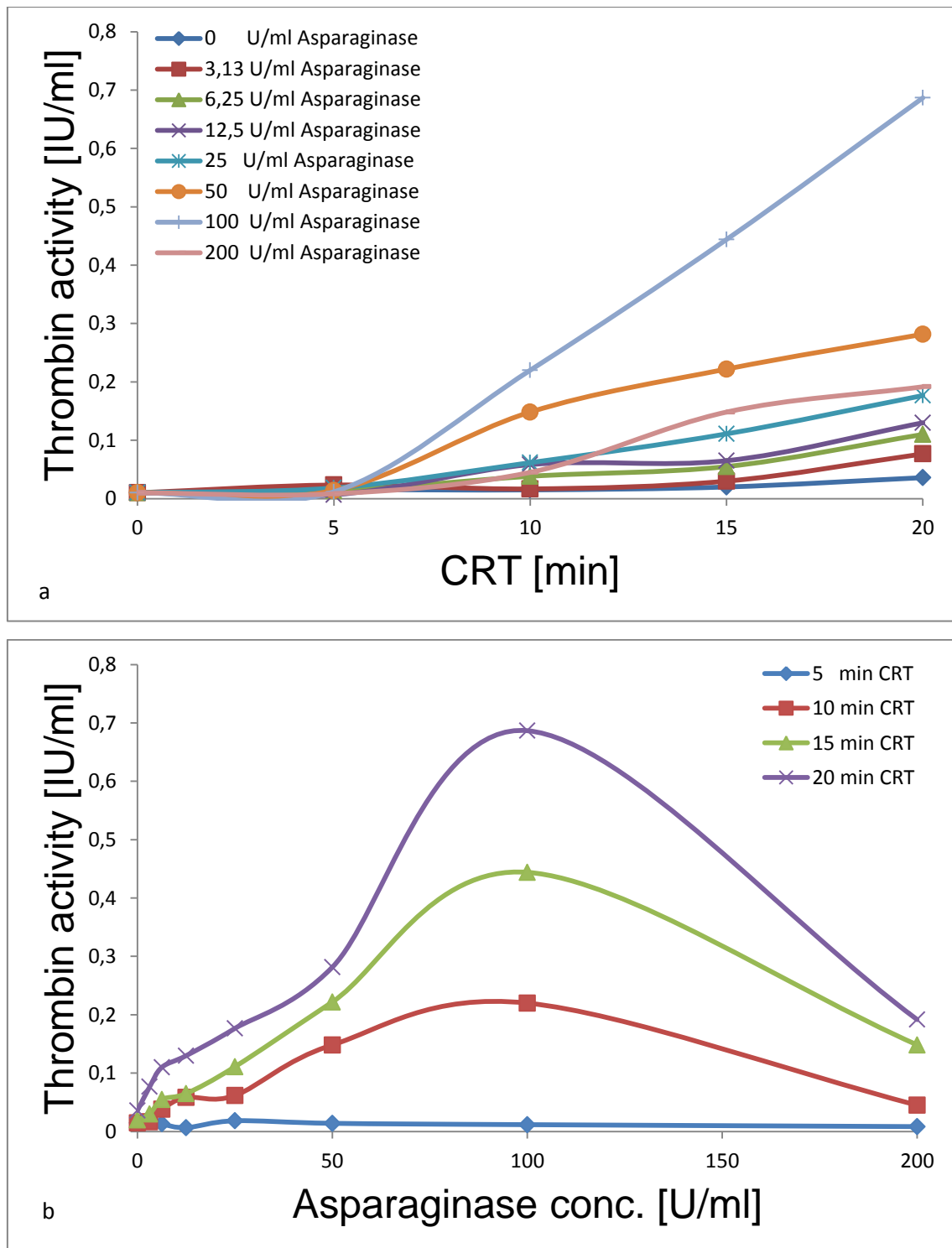


Abbildung 44: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 200 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 2,5 U/ml Asparaginase.

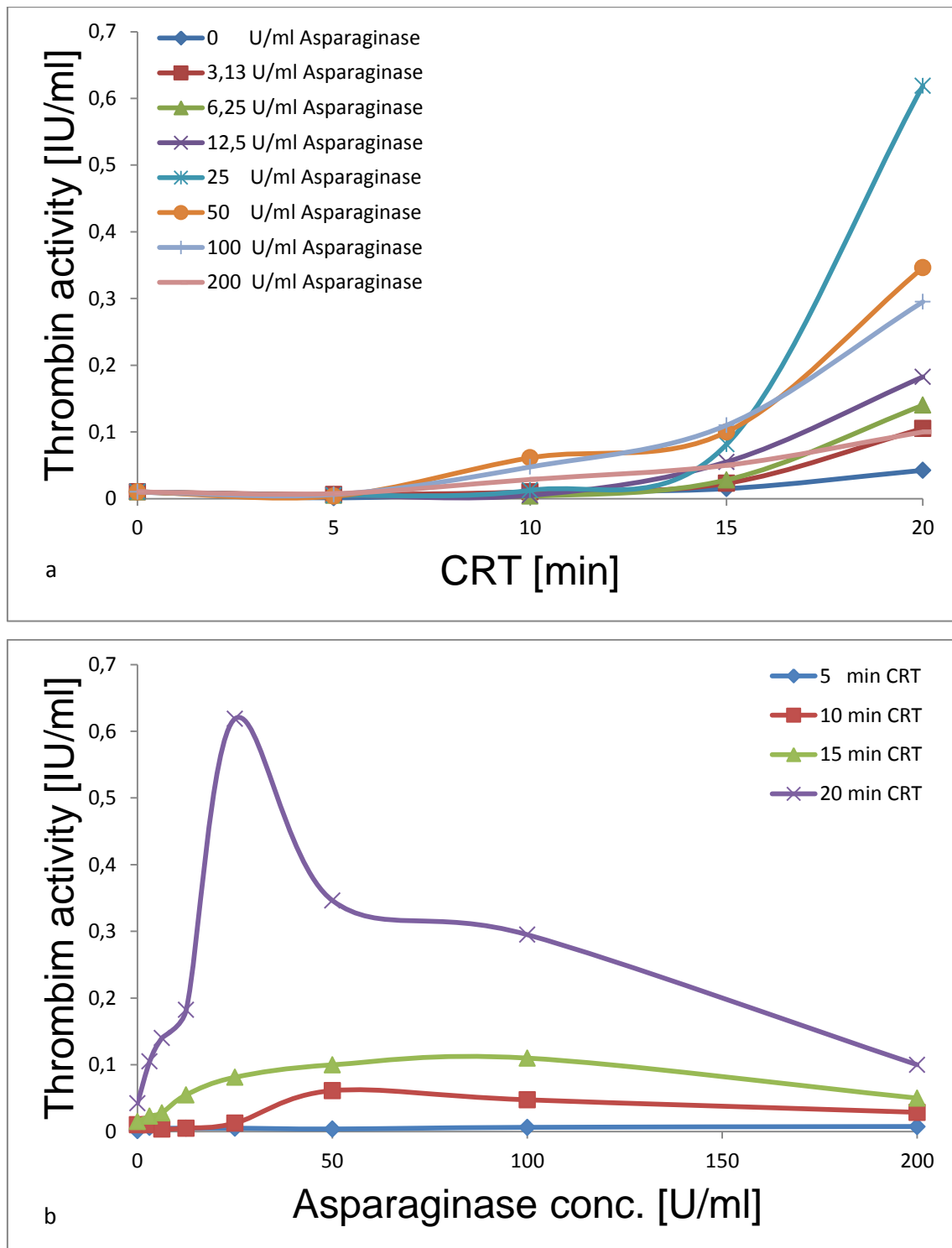


Abbildung 45: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 200 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 3 U/ml Asparaginase.

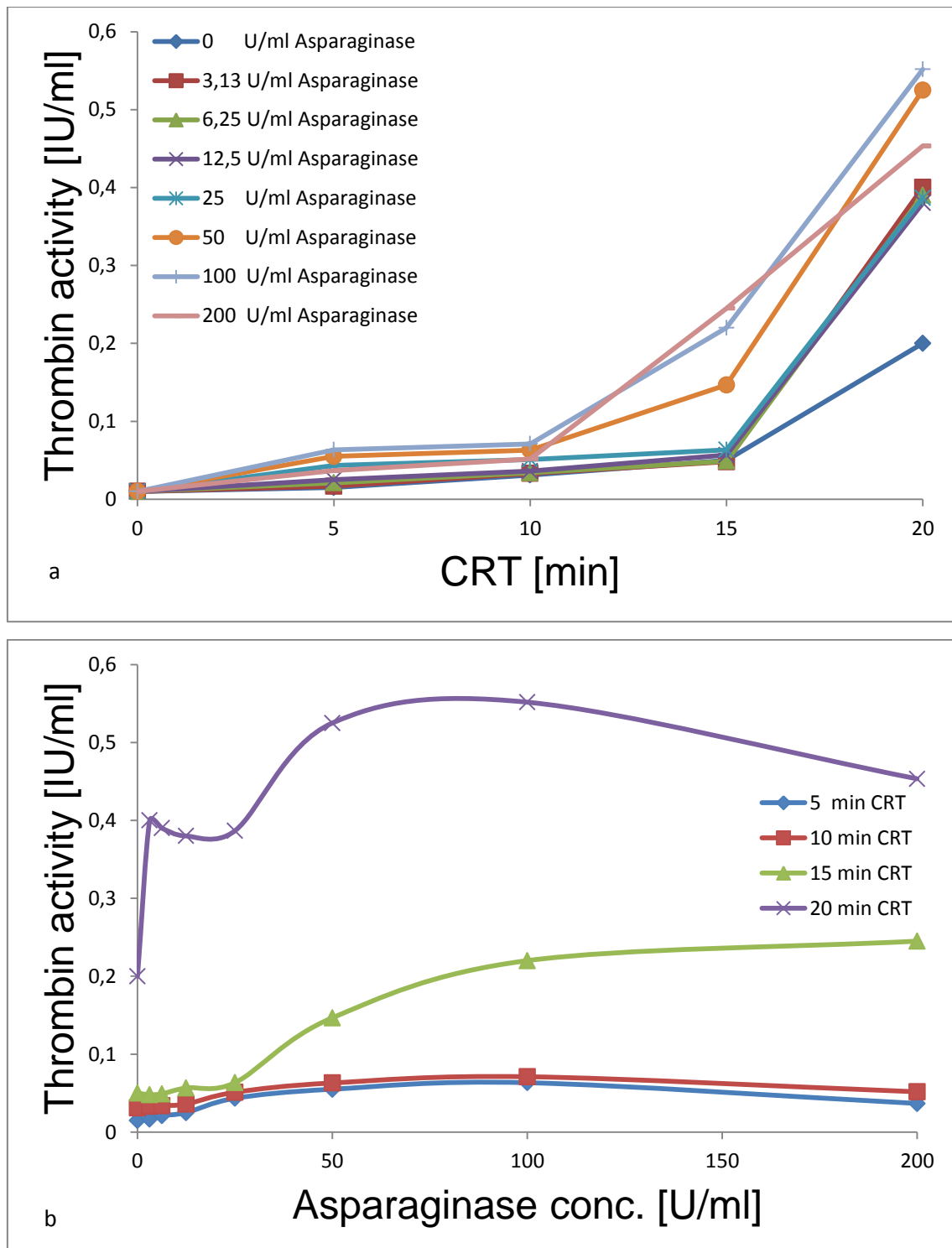


Abbildung 46: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 µl normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 200 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 3 U/ml Asparaginase.

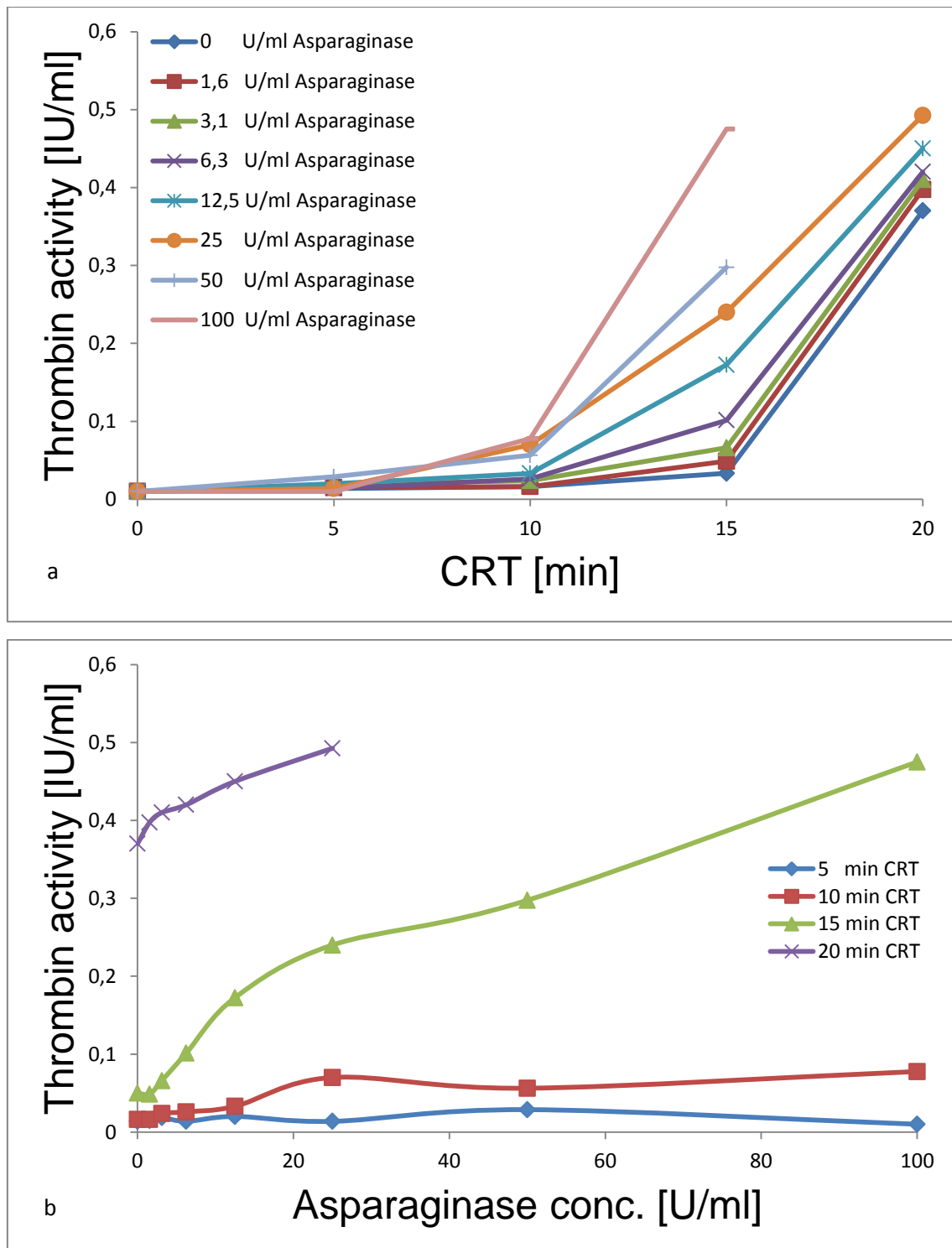


Abbildung 47: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 5 U/ml Asparaginase. Der (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht-valide Teil der Kurven wurde weggelassen.

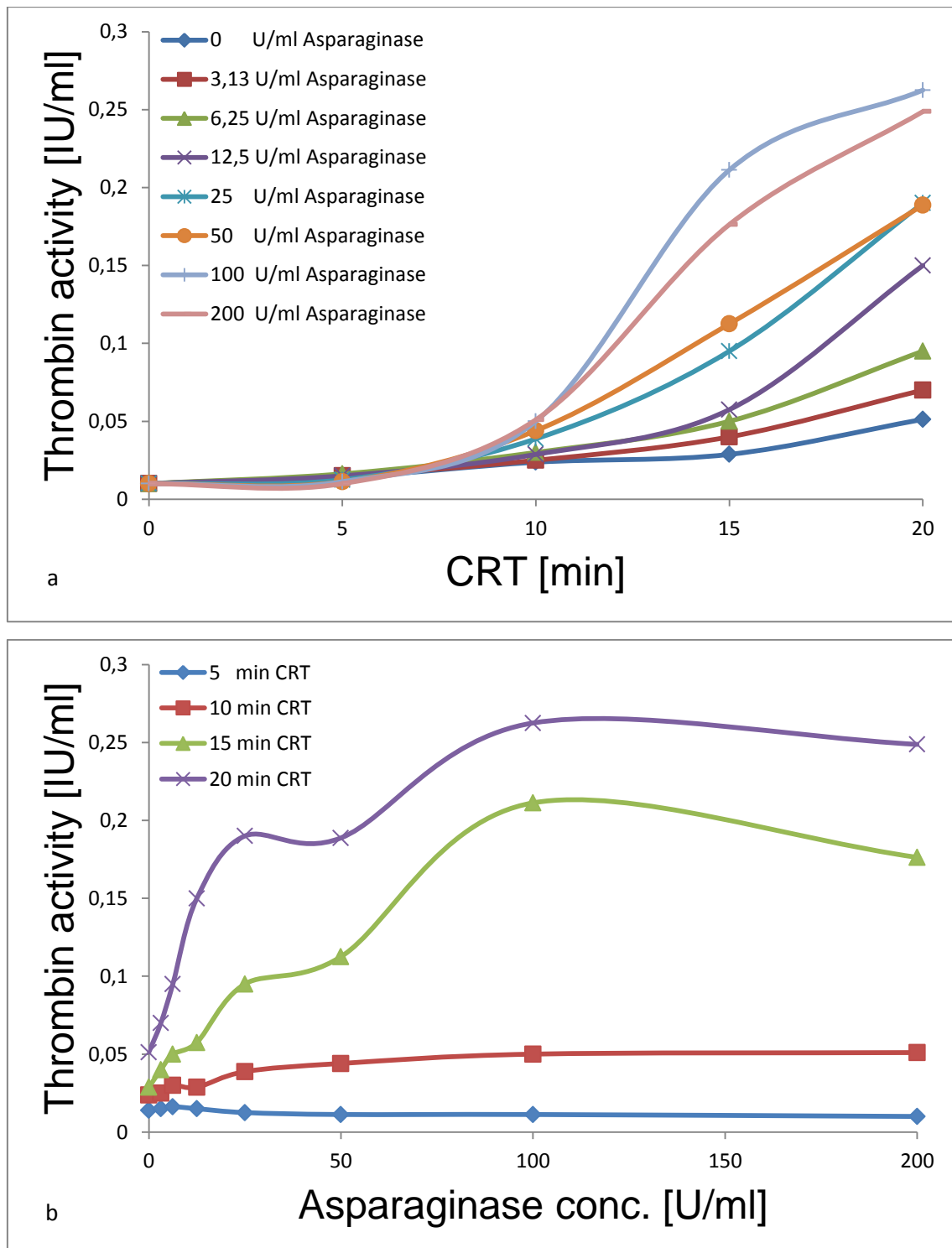


Abbildung 48: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 200 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 6 U/ml Asparaginase.

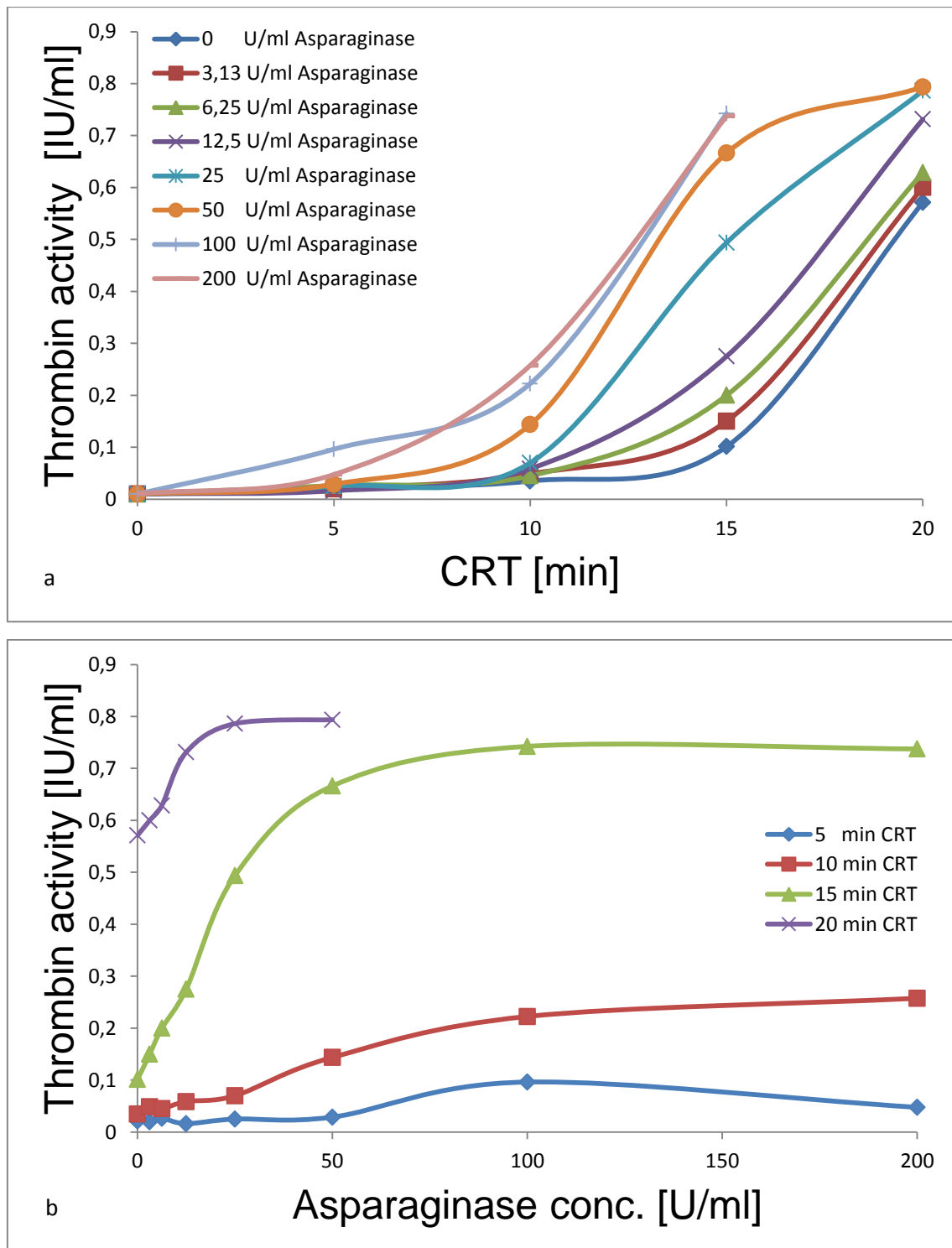


Abbildung 49: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 200 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 6 U/ml Asparaginase. Der (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht-valide Teil der Kurven wurde weggelassen.

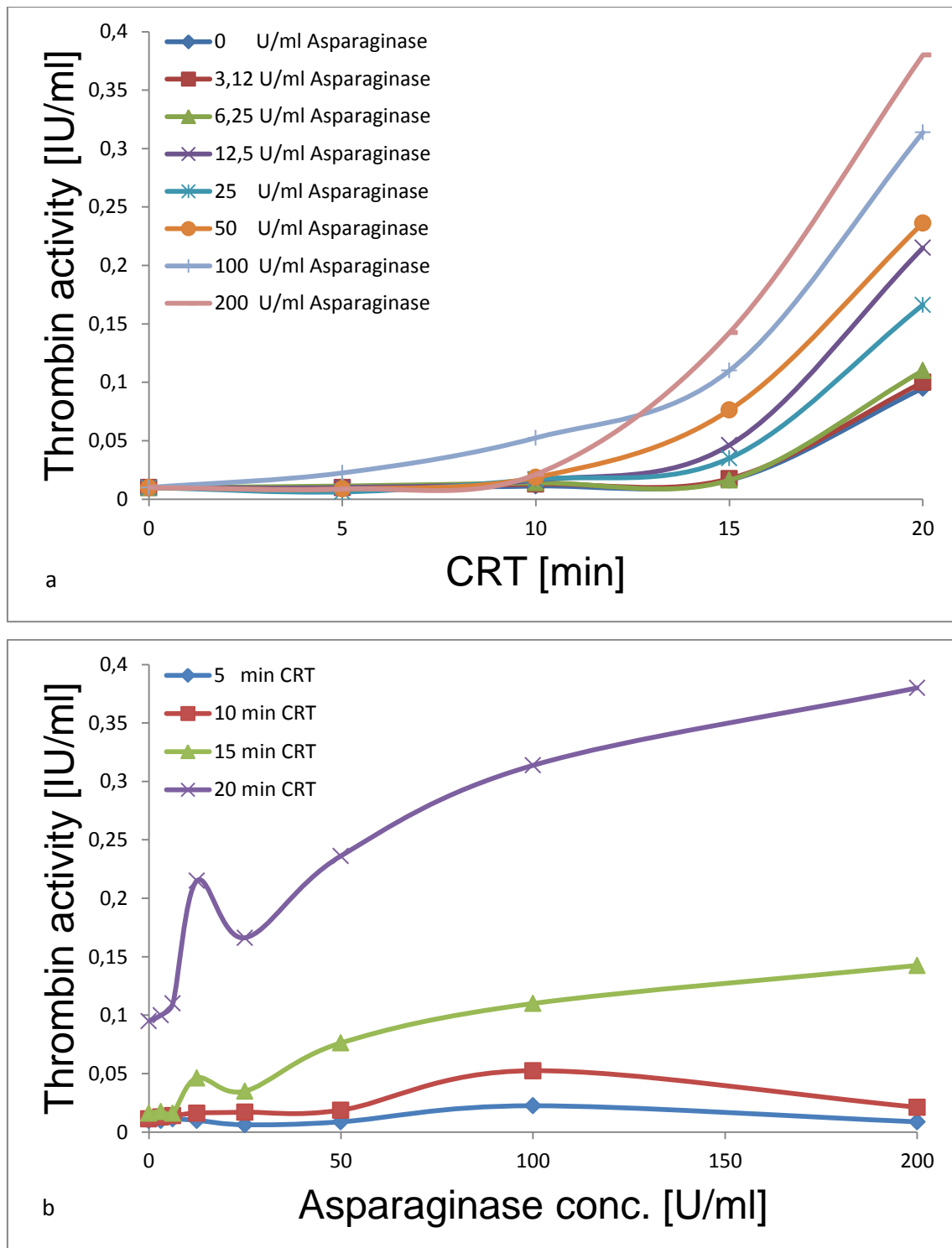


Abbildung 50: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 200 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 10 U/ml Asparaginase.

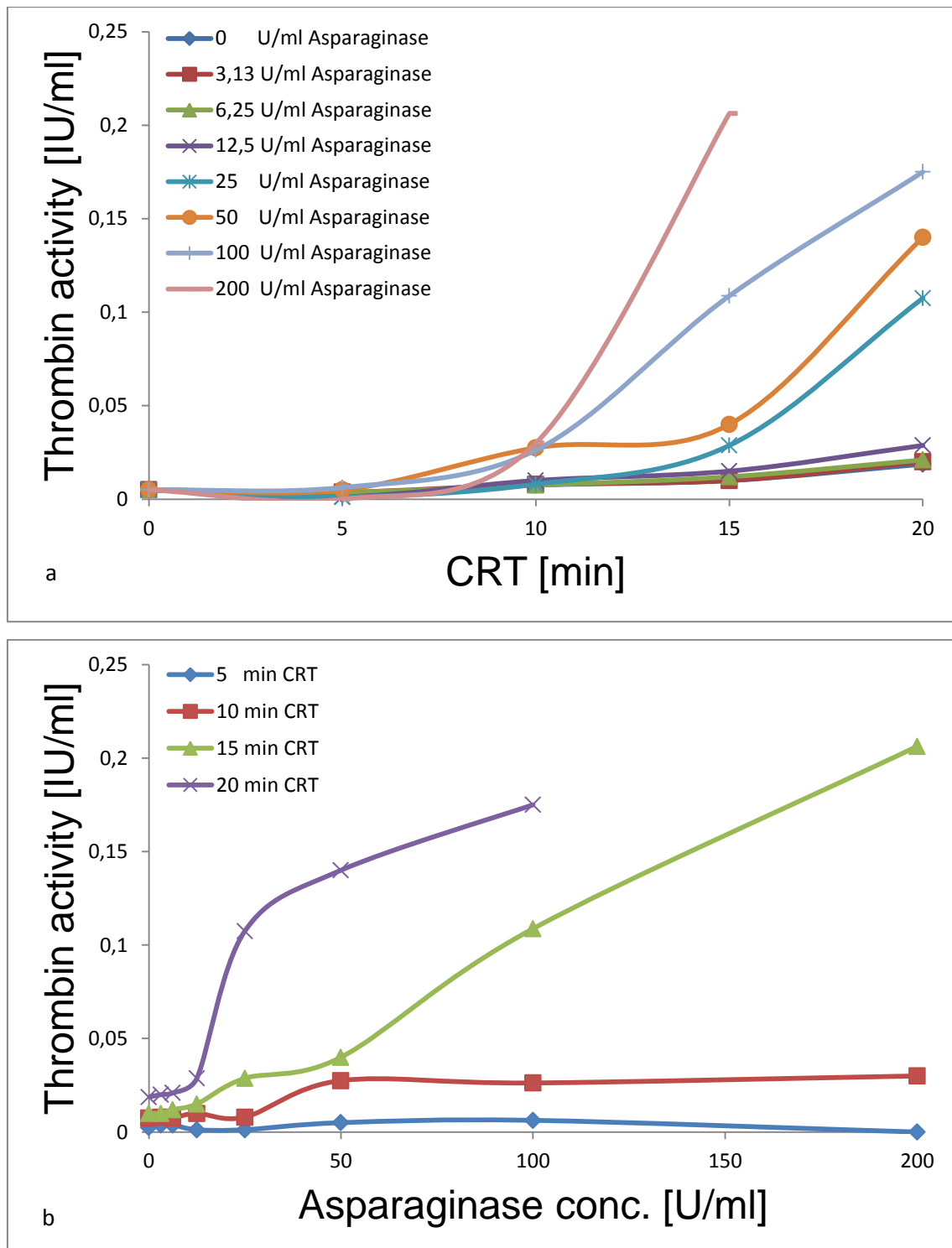


Abbildung 51: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 200 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 20 U/ml Asparaginase. Der (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht-valide Teil der Kurven wurde weggelassen.

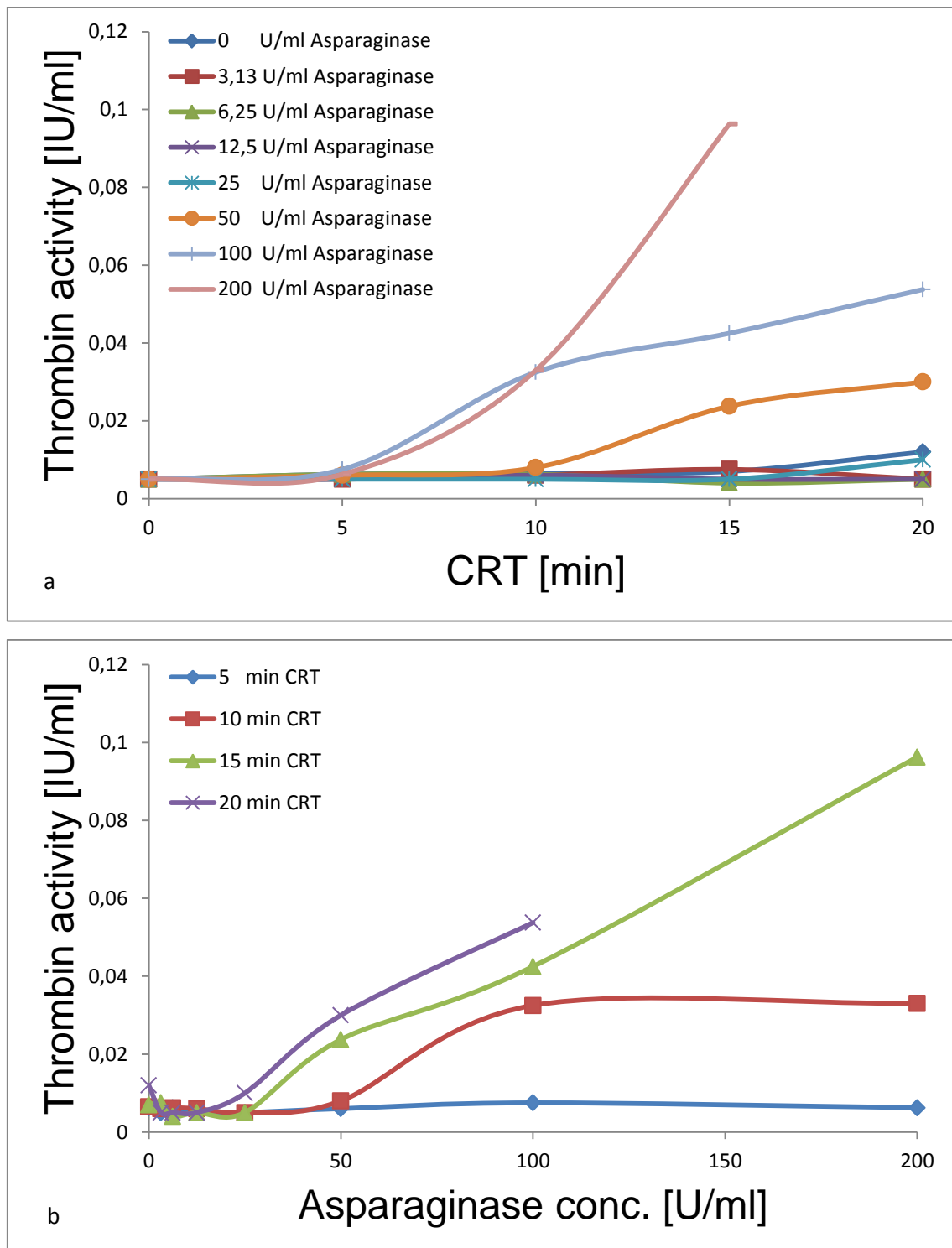


Abbildung 52: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 200 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 30 U/ml Asparaginase. Der (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht-valide Teil der Kurven wurde weggelassen.

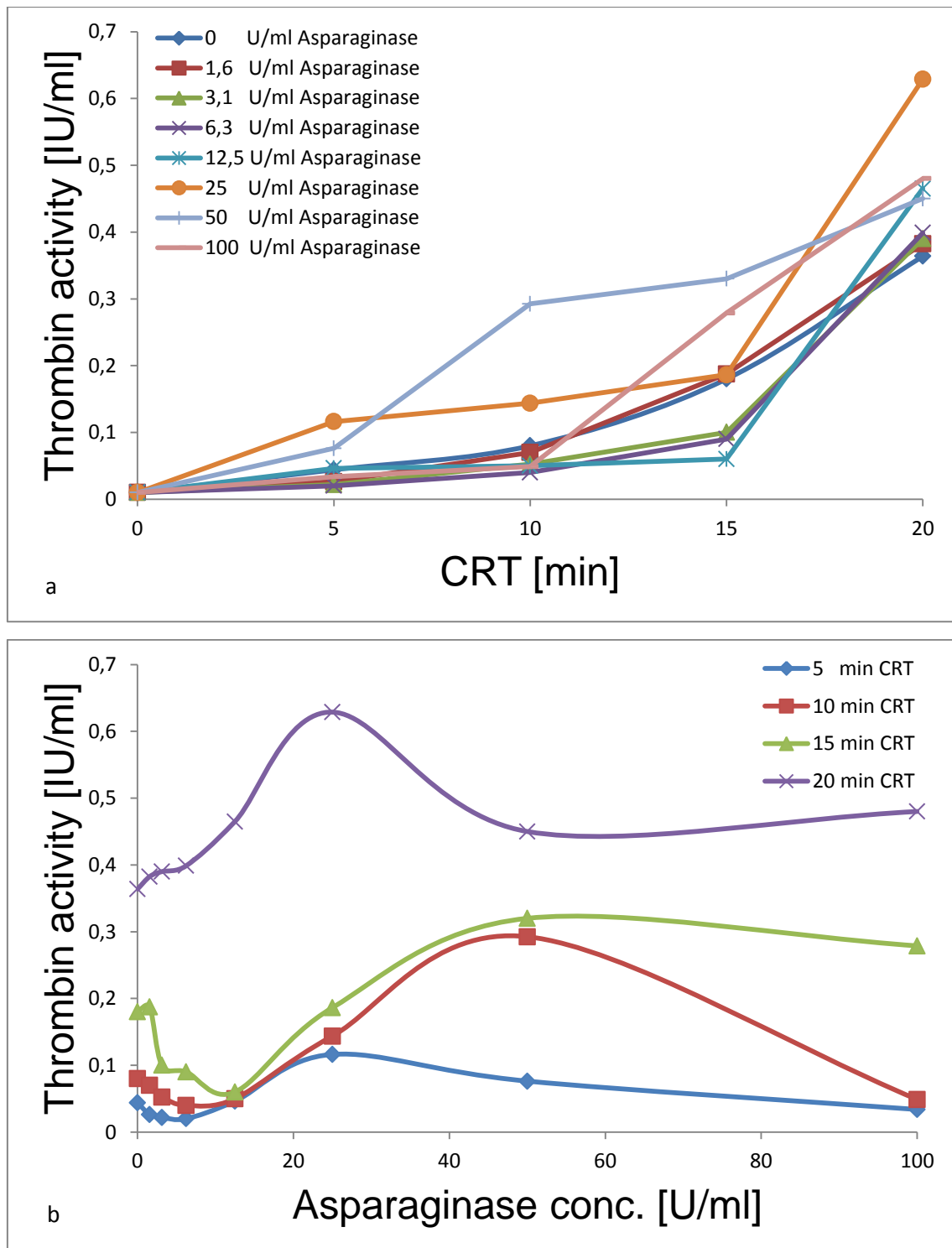


Abbildung 53: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 μ l normales Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 16 U/ml Asparaginase, der approx. IC50 bei 3 U/ml.

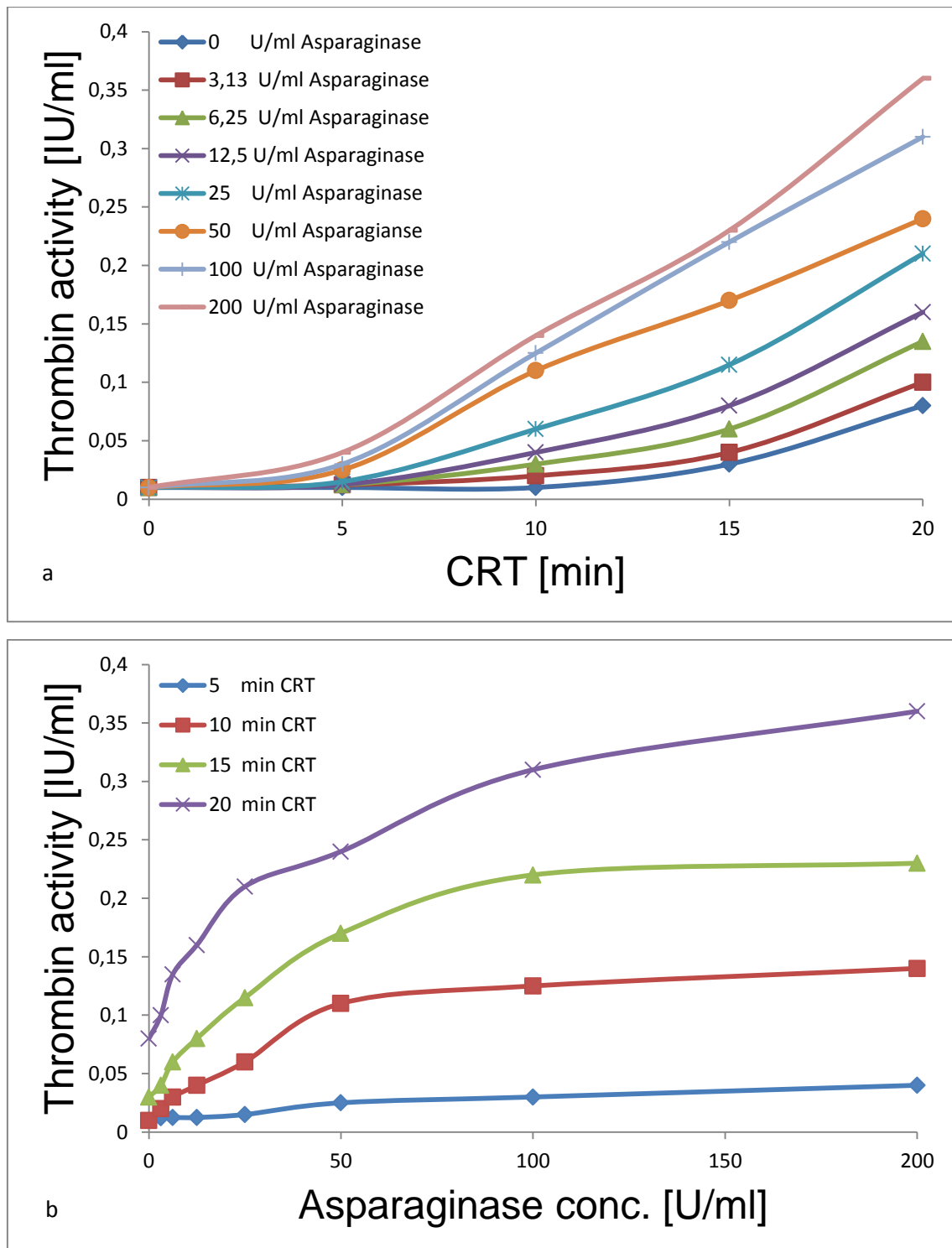


Abbildung 54: Durchschnittswerte der Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Es wurden die Durchschnittswerte von $n = 46$ normalen Plasmaproben, die mit Asparaginase versetzt wurden, ermittelt. Die approx. SC200 lag bei 5 U/ml Asparaginase.

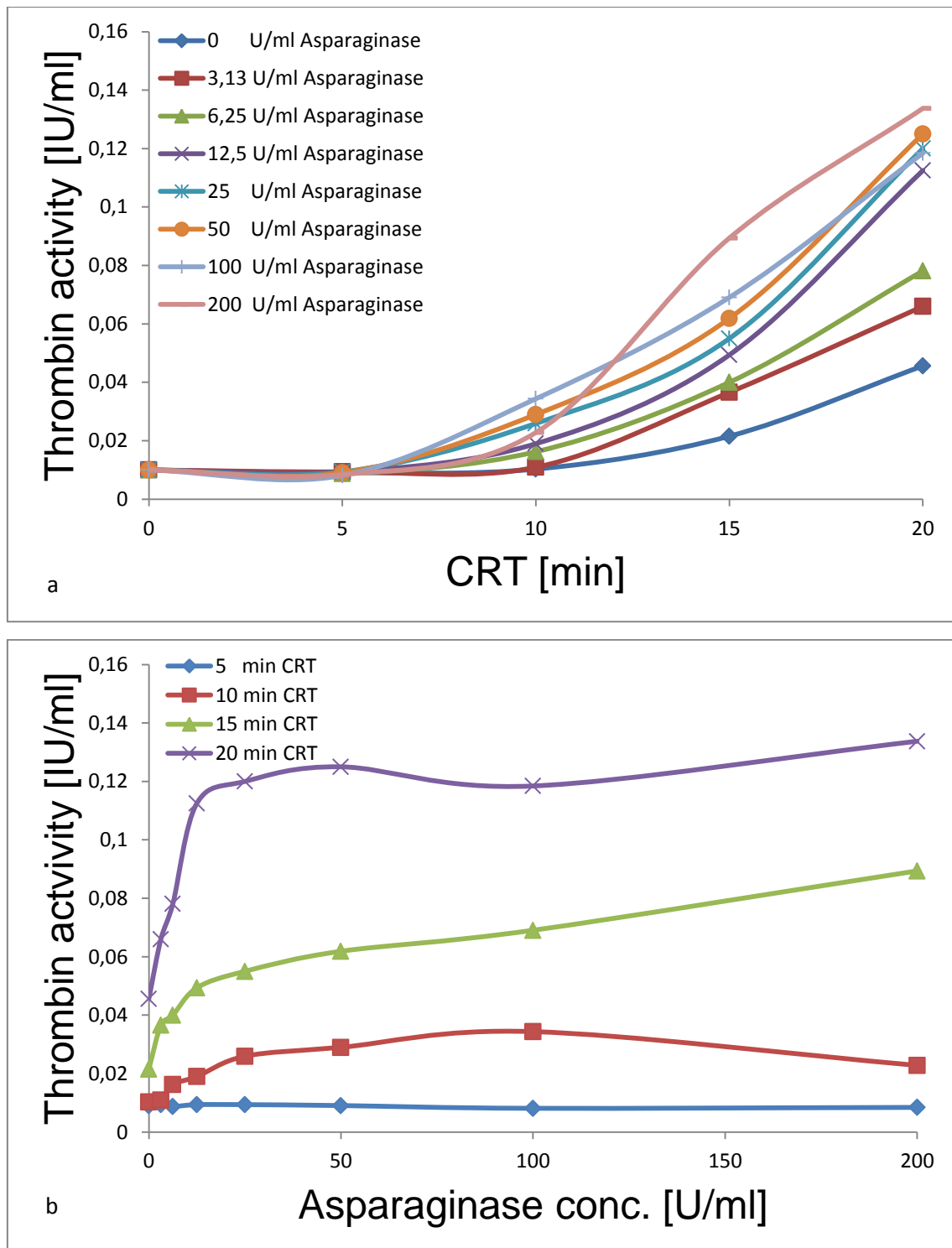


Abbildung 55: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 µl normales gepooltes Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 200 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 25 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 6 U/ml Asparaginase.

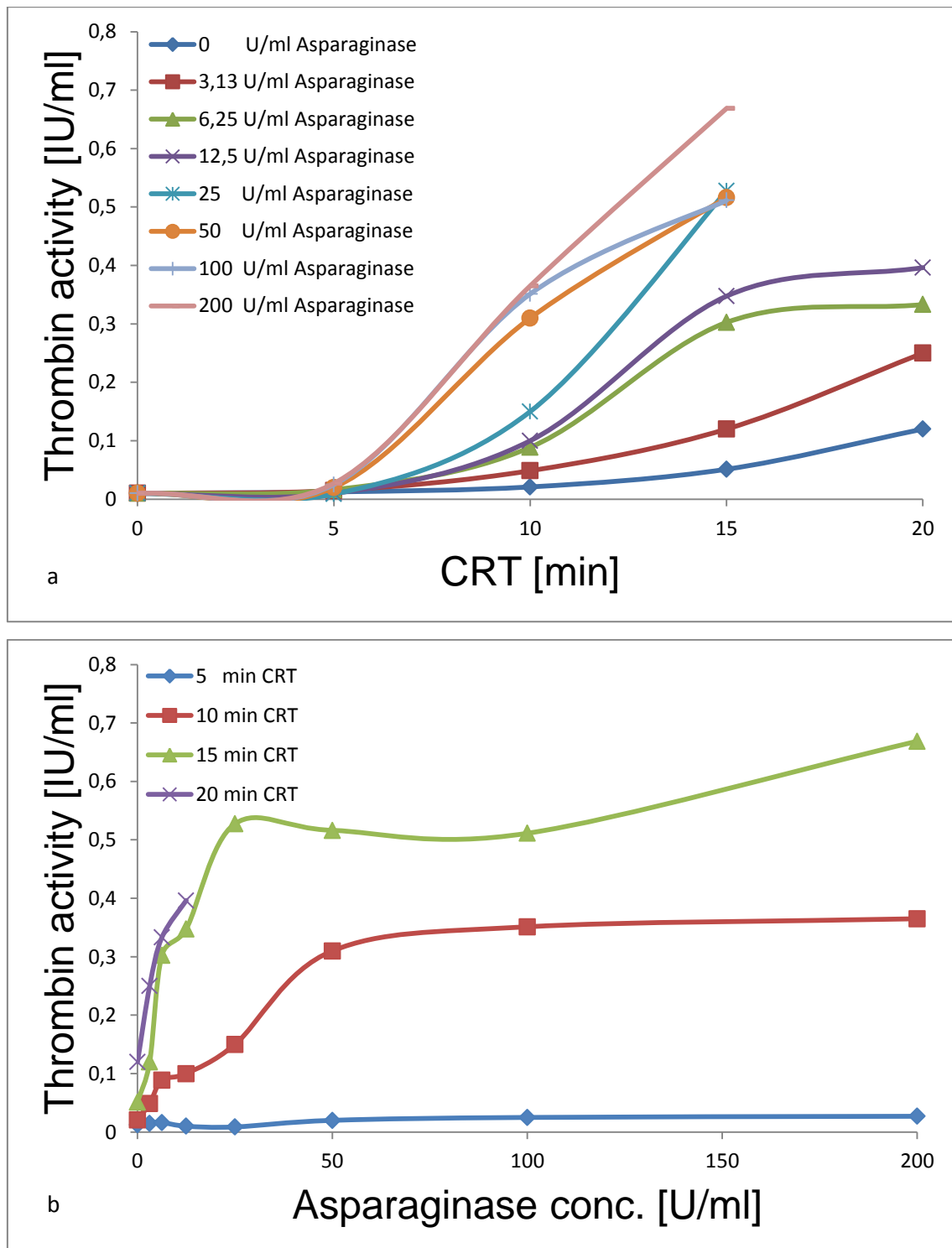


Abbildung 56: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 µl normales gepooltes Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 200 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 20 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 3 U/ml Asparaginase. Der (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht-valide Teil der Kurven wurde weggelassen.

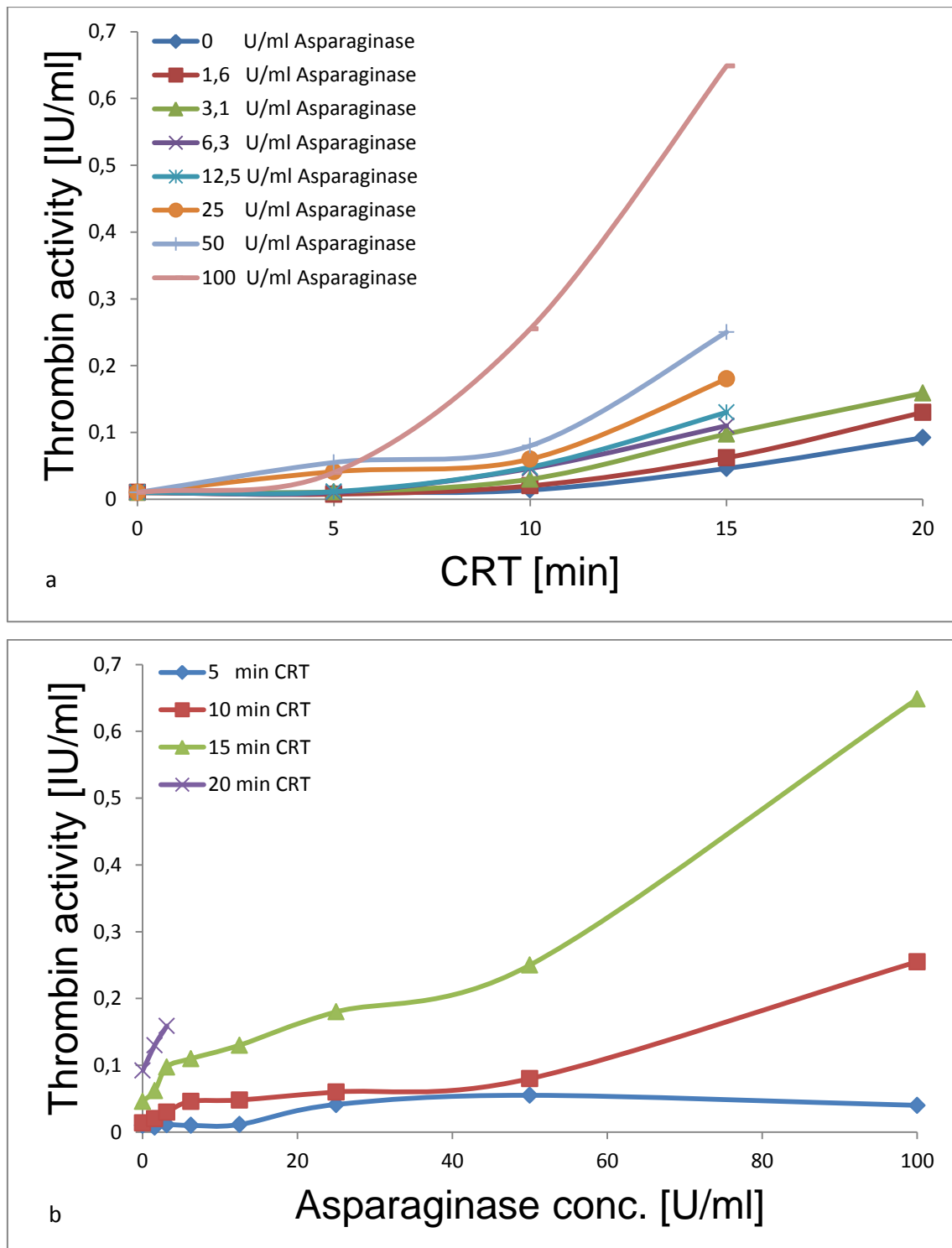


Abbildung 57: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 µl normales gepooltes Citratplasma wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 25 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 3 U/ml Asparaginase. Der (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht-valide Teil der Kurven wurde weggelassen.

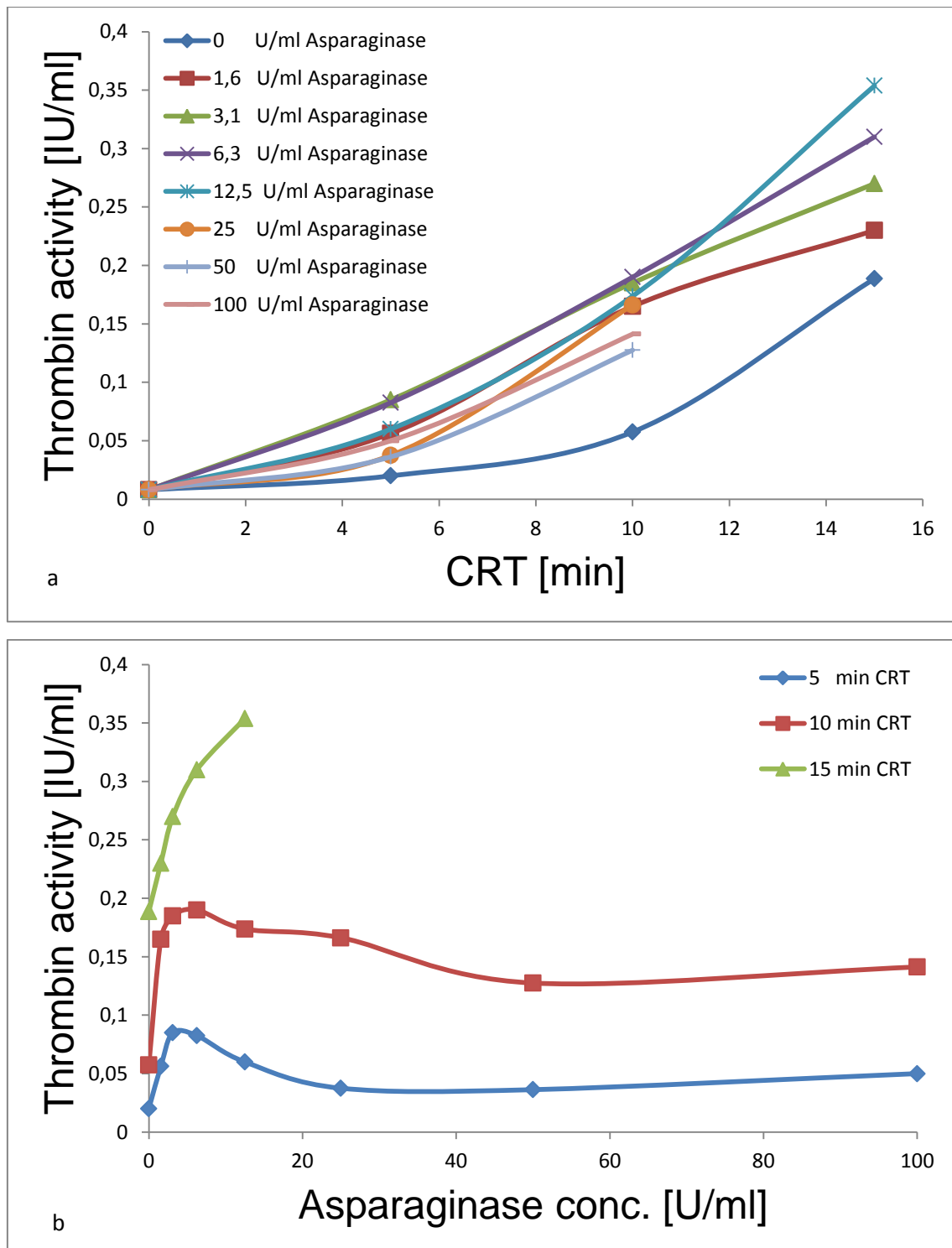


Abbildung 58: Thrombin-Generierung in Frischplasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 µl normales Frischplasma, was nicht älter als >1h war, wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 15 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt. Die approx. SC200 lag bei 1 U/ml der alten Charge Asparaginase. Der (wegen Antithrombin 1-Entstehung) nicht-valide Teil der Kurven wurde weggelassen.

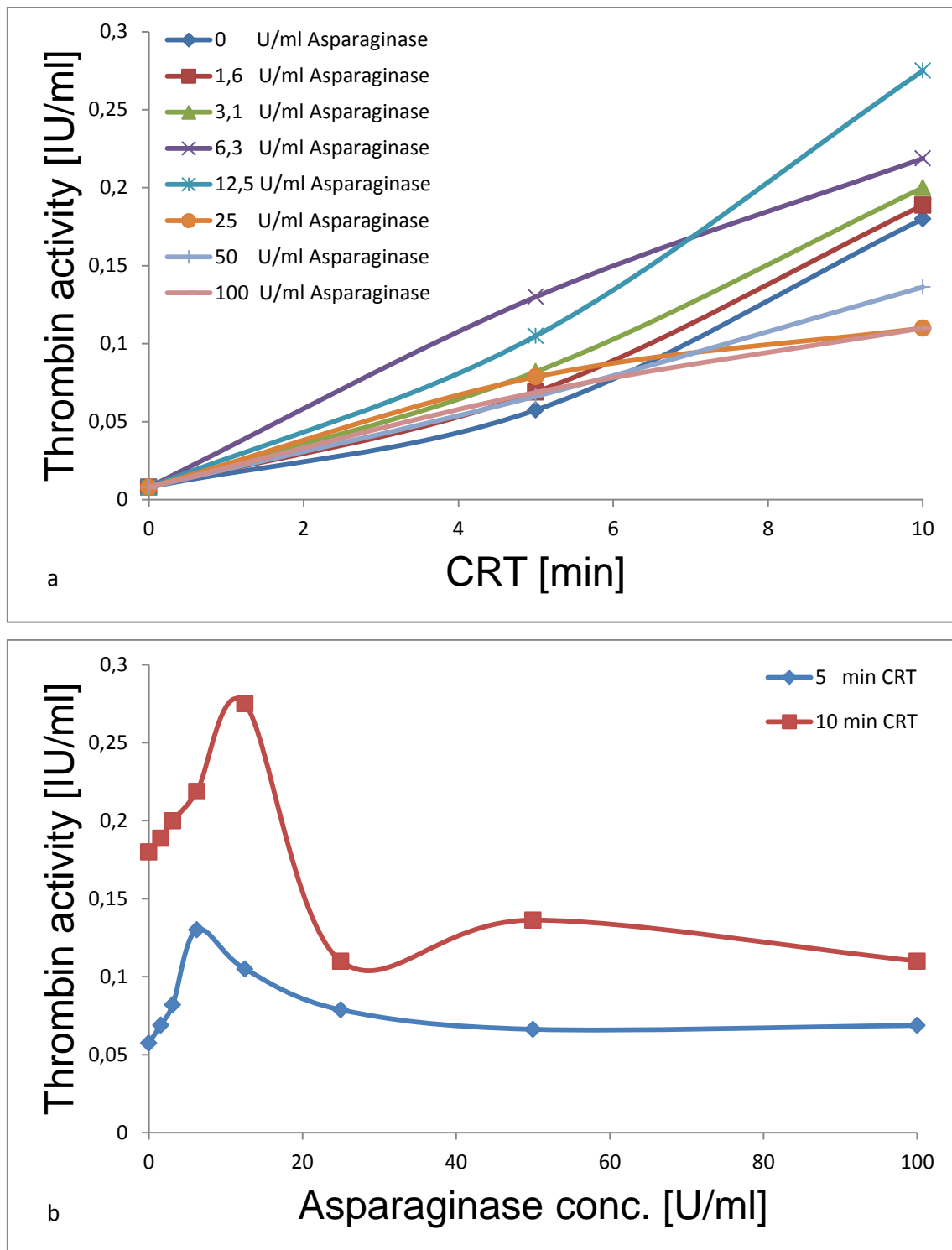


Abbildung 59: Thrombin-Generierung in Frischplasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

50 µl normales Frischplasma, was nicht älter als >1h war, wurde in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1 + 1 Mischung mit 0 - 100 U/ml Asparaginase der neuen Charge (a) versehen. Anschließend wurde der RECA mit 5 - 15 min CRT (b) zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt, um vergleichend die Auswirkungen der alten (Abb. 58) und der neuen Charge Asparaginase (Abb. 59) auf das Frischplasma zu analysieren. Die approx. SC200 lag bei 5 U/ml Asparaginase.

4.3 RECA mit Plasmaproben unter Zugabe von PEG-Asparaginase im Vergleich zur nativen *E. coli* Asparaginase

Im letzten Versuchsabschnitt des Hauptteils wurden vierzehn Plasmaproben und zwei daraus gewonnene Pools mit der nativen Asparaginase oder der PEG-Asparaginase versetzt und vergleichend analysiert.

Tabelle 7 zeigt zusammenfassend die daraus resultierenden Ergebnisse. Es werden die Mittelwerte ± 1 Standardabweichungen (MV ± 1 SD) der approx. SC200 und approx. IC50 der nativen Asparaginase und der modifizierten Form der Asparaginase der PEG-Asparaginase dargestellt. Die approximativen SC200- oder IC50-Werte von beiden Asparaginasen korrelierten mit einem Korrelationskoeffizienten (r) von größer 0,9.

Asparaginasepräparation	Approx. IC50 (MW ± 1 SD)	Approx. SC200 (MW ± 1 SD)
Native <i>E. coli</i> Asnase	16 \pm 28 U/ml	16 \pm 26 U/ml
PEG-Asnase	18 \pm 28 U/ml	19 \pm 30 U/ml

Tabelle 7: Ermittelte SC200- und IC50-Werte der 14 Plasmaproben unter Zusatz nativer *E. coli* Asparaginase und PEG-Asnase

Tabelle 8 auf der nächsten Seite zeigt exemplarisch, dass sich die SC200 in vier individuellen normalen untersuchten Plasmen für beide Typen von Asparaginasen sehr ähnlich verhalten. In einer der vier Plasmaproben wurde durch beide Asparaginasen weder die Thrombin-Generierung stimuliert noch inhibiert.

Eine IC50 erschien bei der nativen *E. coli* Asparaginase nur in einer der vier Proben, während die PEG-Asnase in drei Proben eine IC50 mit Werten von 6 - 40 U/ml erreichte.

Plasmaprobe	IC50 <i>E. coli</i> Asnase	IC50 PEG- Asnase	SC200 <i>E. coli</i> Asnase	SC200 PEG- Asnase
1 (Abb.60)	6 U/ml	6 U/ml	7 U/ml	7 U/ml
2 (Abb.61)	--	--	5 U/ml	5 U/ml
3 (Abb.62)	--	2 U/ml	5 U/ml	5 U/ml
4 (Abb.63)	--	--	--	--

Tabelle 8: Plasmaproben 1-4 jeweils versetzt mit *E. coli* Asnase und PEG-Asparaginase und die dazugehörigen analysierten IC50- und SC200-Werte

Abb. 60-63 demonstrieren die jeweiligen Thrombin-Generierungskurven der Plasmaproben aus Tabelle 8.

Wenn man die zugefügten Asparaginaseaktivitäten gegen die Durchschnittswerte der Thrombin-Generierung aus Plasmaprobe 1-4 aufträgt (Abb. 64), dann ergeben sich folgende Werte:

Die approximative IC50 war nicht messbar für die native Asparaginase, wohingegen sie bei der PEG-Asnase einen Wert von 36 U/ml erzielte. Die approx. SC200 lag für beide Asparaginasepräparationen bei 6 U/ml Asparaginase.

Abb. 65-70 veranschaulichen sechs zusätzliche Thrombingenerierungskurven aus den insgesamt 14 analysierten Plasmaproben. Dabei zeigt Abb. 65 genau wie in Abb. 63, dass sich das individuelle Plasma als resistent gegenüber den beiden Asparaginasepräparationen verhält. Bei solchen Patienten wäre eine Asparaginasetherapie sogar mit hohen Konzentrationen Hämostase-tolerabel.

Plasmapool 1 (gewonnen aus den Plasmaproben 1-4) war resistent gegenüber der Asparaginase-stimulierenden Wirkung der Thrombin-Generierung: Es trat weder bei der nativen noch bei der PEG-Asnase eine SC200 auf. Bei beiden Asparaginasepräparationen fand sich jedoch eine approx. IC50 von 1 U/ml Asparaginase (Abb. 71).

Plasmapool 2 (gewonnen aus den individuellen Plasmaproben 5-14) hatte eine approx. IC50 von 2 U/ml Asparaginase und eine approx. SC200 von 13 U/ml für die Asnase oder 7 U/ml PEG-Asnase (Abb. 72).

Folglich verhielten sich beide Plasmapools bezüglich der Thrombin-Generierung unterschiedlich. Eine resistente oder sensible Plasmaprobe könnte evtl. den ganzen Pool beeinflussen.

Die Auswertungen der individuellen Plasmen sind jedoch wichtiger als die Analyse der gepoolten Plasmen. Wertet man alle 14 individuellen Plasmaproben mit ihrer Thrombin-Generierung zusammen aus, dann ergeben sich interessante Ergebnisse. Tabelle 9 fasst diese zusammen.

Asparaginasepräparation	Ermittelte approx. IC50 in 14 Plasmaproben	Ermittelte approx. SC200 in 14 Plasmaproben
<i>E. coli</i> Asnase	n = 8 (57 %)	n = 10 (71 %)
PEG-Asnase	n = 11 (79 %)	n = 11 (79 %)

Tabelle 9: Prozentualer Anteil aller analysierten Plasmaproben, die eine SC200 oder IC50 hatten

Eine messbare IC50 fand sich bei 8/14 (57 %) der mit *E. coli* Asnase und 11/14 (79 %) der mit PEG-Asnase versetzten Proben. 10/14 (71 %) der *E. coli* Asnase versetzten und 11/14 (79 %) der mit PEG-Asnase versetzten Plasmaproben verfügten über einen SC200-Wert (Tabelle 9). Die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen finden sich in Tabelle 7. Die approx. IC50 von beiden Asparaginasepräparationen korrelierten mit einem $r = 0,995$ (Abb. 73), die approx. SC200-Werte mit einem $r = 0,990$ (Abb. 74). Zusammenfassend lässt sich bei dieser guten Korrelation sagen, dass sich kein markanter Unterschied zwischen den beiden Asparaginasepräparationen ergab. Beide wirkten sich sowohl pro- als auch antithrombotisch auf die Gerinnung aus.

Im Folgenden werden die Abbildungen von individuellen Plasmaproben nach Zusatz der beiden Asparaginasepräparationen vergleichend in Bezug auf ihre Thrombin-Generierung gegenüber der Asparaginasekonzentration dargestellt.

Für die Versuche wurden 40 µl normales Citratplasma in Mikrotiterplatten versetzt und unter repetitiver 1:1 Mischung mit 0 – 100 U/ml der nativen *E. coli* Asnase oder der PEG-Asnase versehen. Bei den Plasmapools wurden jeweils 40 µl normales, gepooltes Citratplasma verwendet. Anschließend wurde der RECA mit 0 - 15 min CRT zur Messung der Thrombin-Generierung durchgeführt.

Danach folgten für jede der Asparaginasen die SC200- und IC50-Bestimmung, sofern möglich.

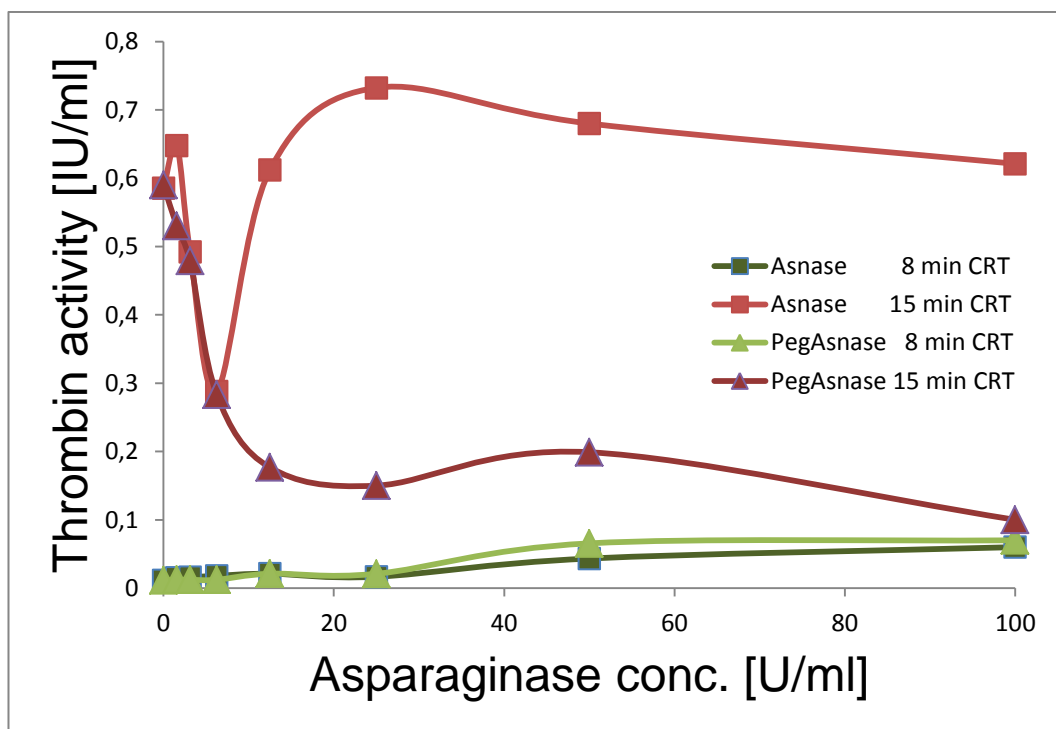


Abbildung 60: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Die approx. IC50/SC200 lag für beide Asparaginasetypen bei 6 U/ml bzw. 7 U/ml.

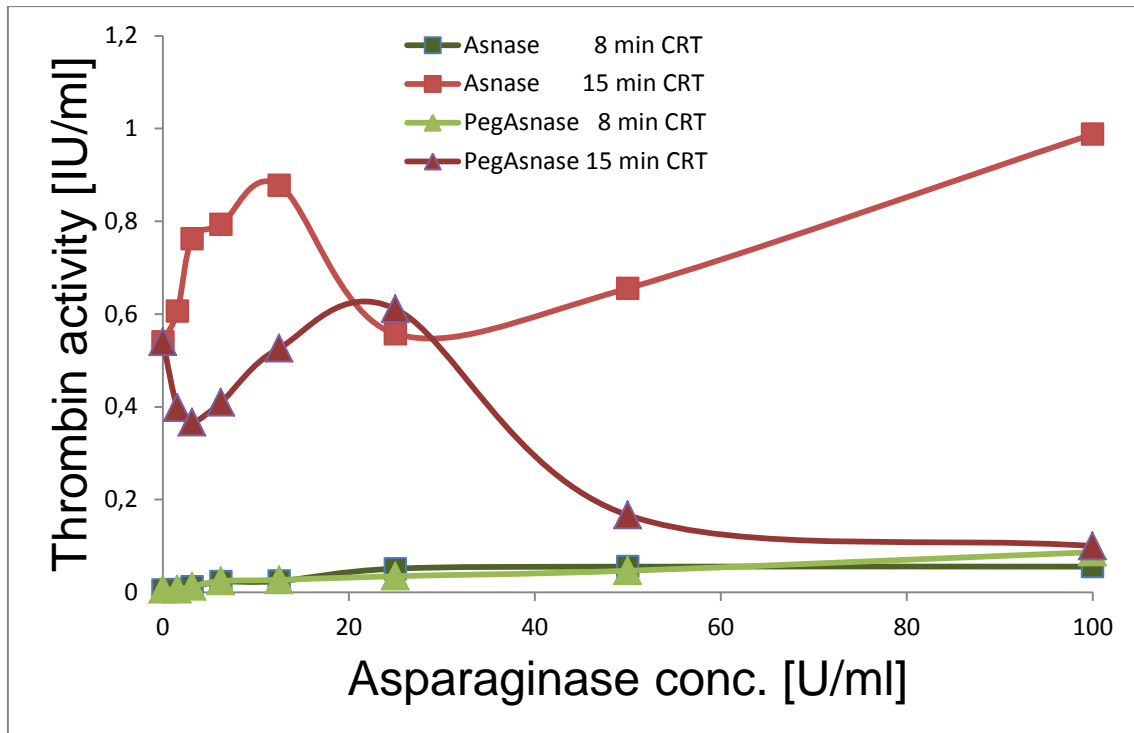


Abbildung 61: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Die approx. SC200 erreichte einen Wert von 5 U/ml für beide Asparaginasetypen.

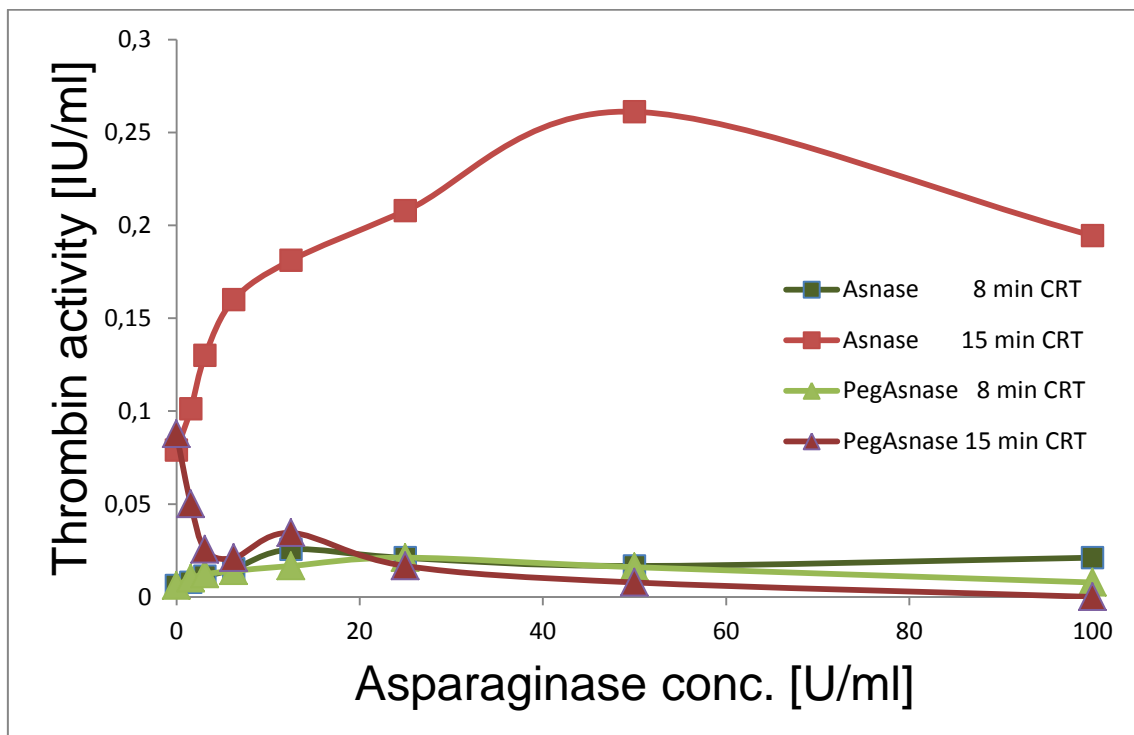


Abbildung 62: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Die approx. IC50 lag bei 2 U/ml für die PEG-Asnase, die approx. SC200 hatte einen Wert von 5 U/ml für beide Asparaginasetypen.

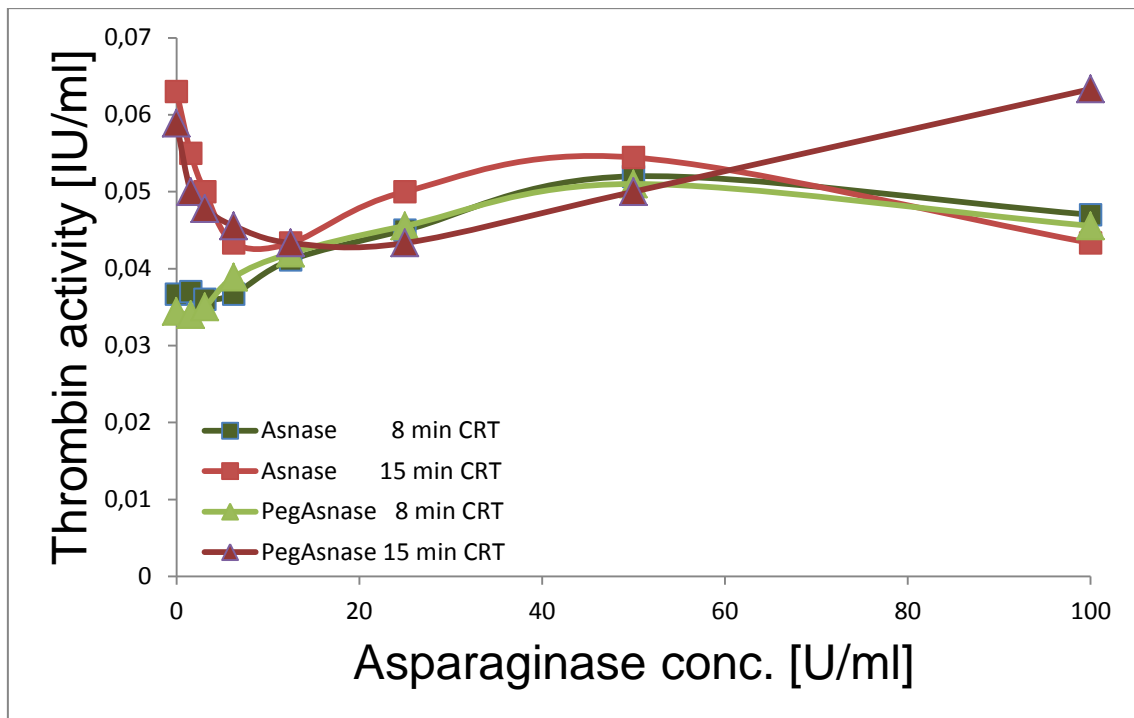


Abbildung 63: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Für beide Asparaginasetypen konnte weder eine IC₅₀ noch eine SC₂₀₀ ermittelt werden. Diese Plasmaprobe erwies sich als resistent gegenüber den Asparaginasen.

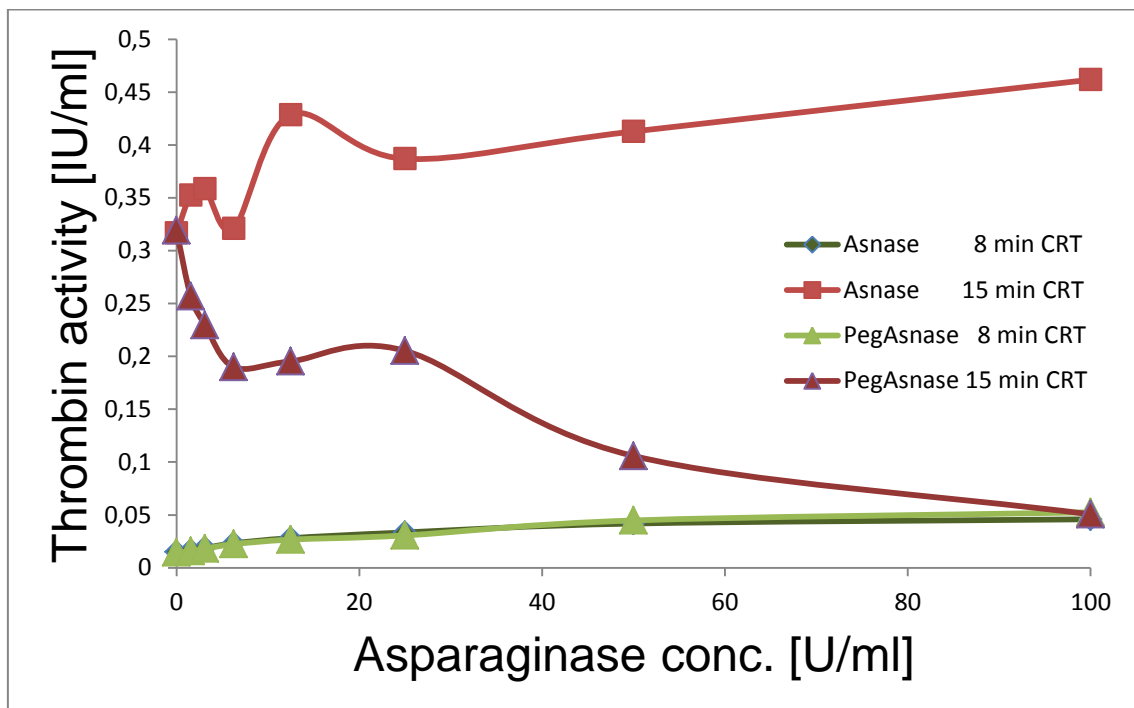


Abbildung 64: Durchschnittswerte der Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Es wurden die Durchschnittswerte von Abb. 61-64 berechnet. Es ergab sich eine approx. IC₅₀ von 36 U/ml für die PEG-Asnase, die approx. SC₂₀₀ lag bei 6 U/ml für beide Asparaginasetypen.

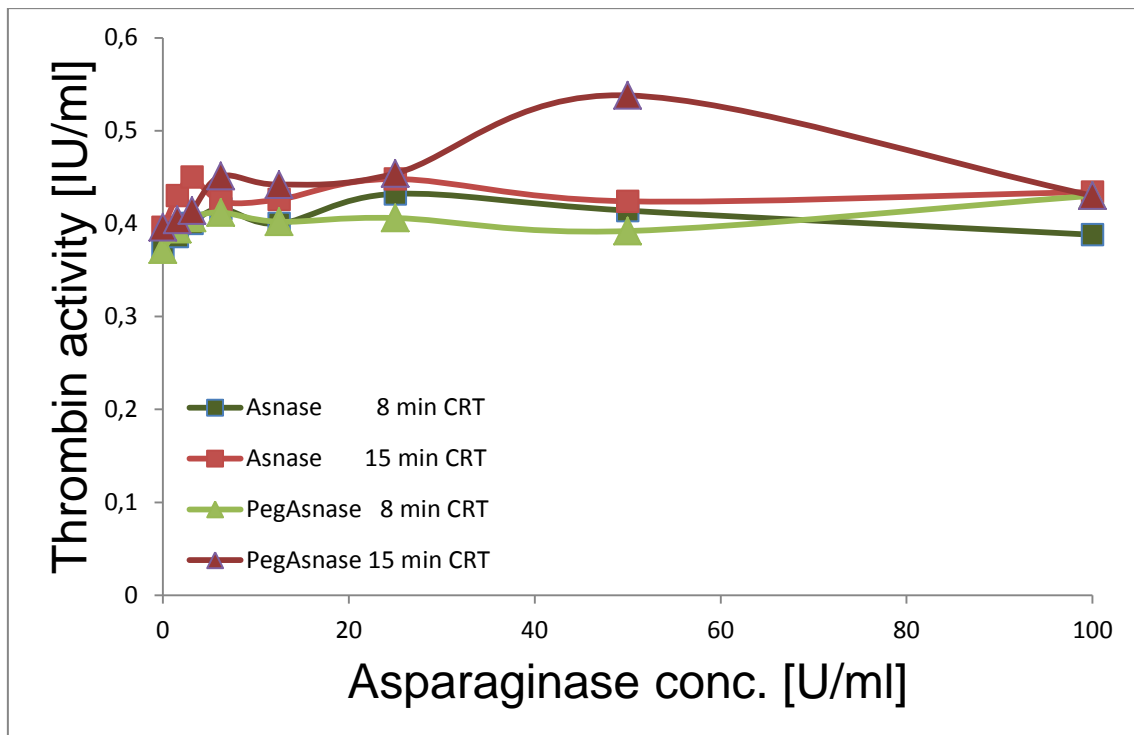


Abbildung 65: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Es konnte keine SC200/IC50 ermittelt werden. Diese normale Plasmaprobe verhielt sich genauso wie in Abb. 64 dargestellt, resistent gegenüber den Asparaginasen.

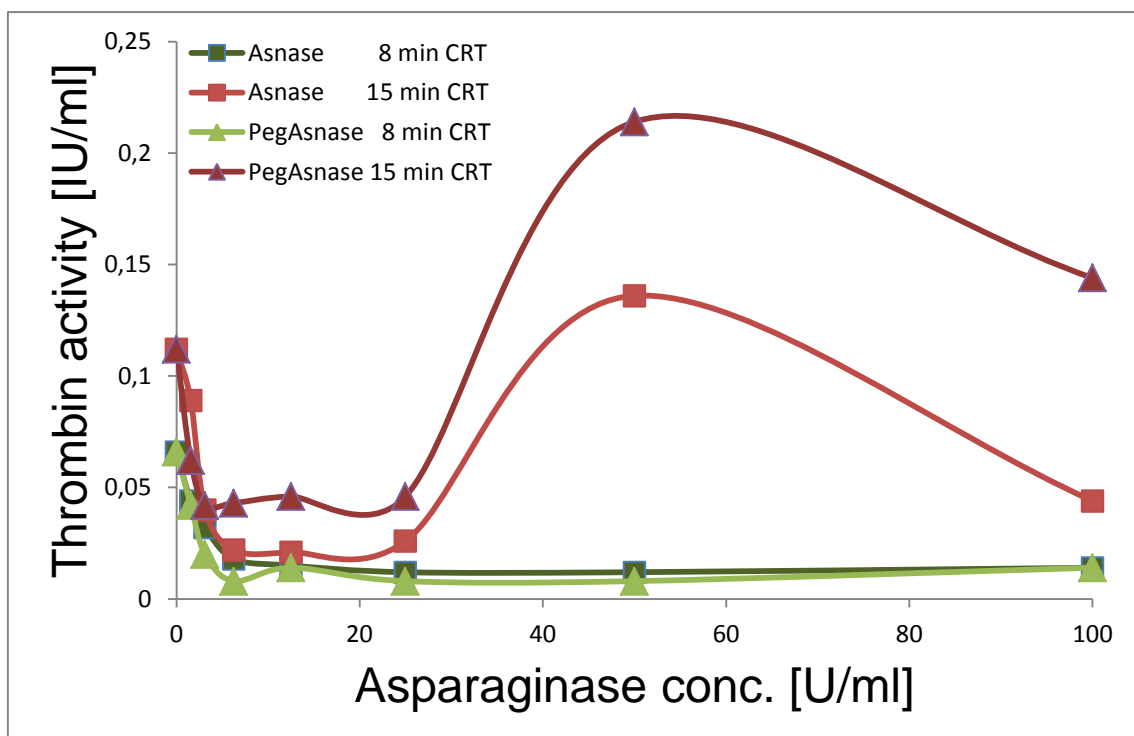


Abbildung 66: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Die approx. IC50 lag bei 3 U/ml Asnase oder 2 U/ml PEG-Asnase, die approx. SC200 erreichte einen Wert von 50 U/ml für die PEG-Asnase.

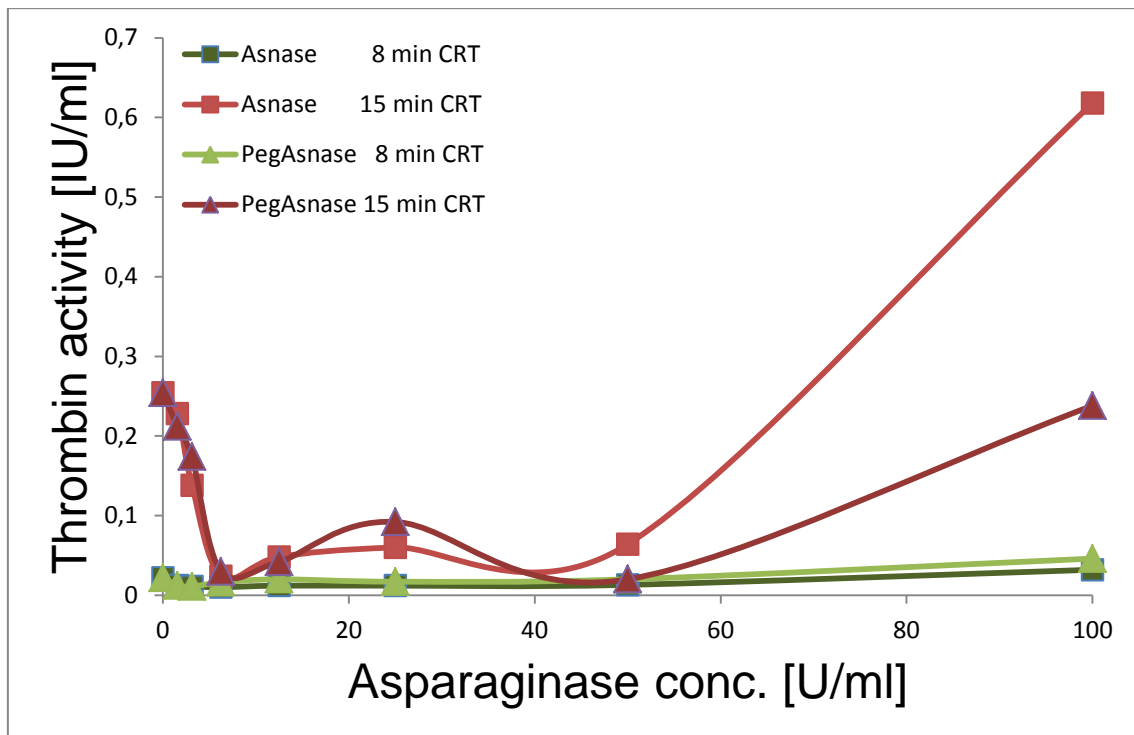


Abbildung 67: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Die approx. IC50 lag bei 3 U/ml für beide Asparaginasen, die approx. SC200 erreichte einen Wert von 90 U/ml Asnase oder 98 U/ml PEG-Asnase.

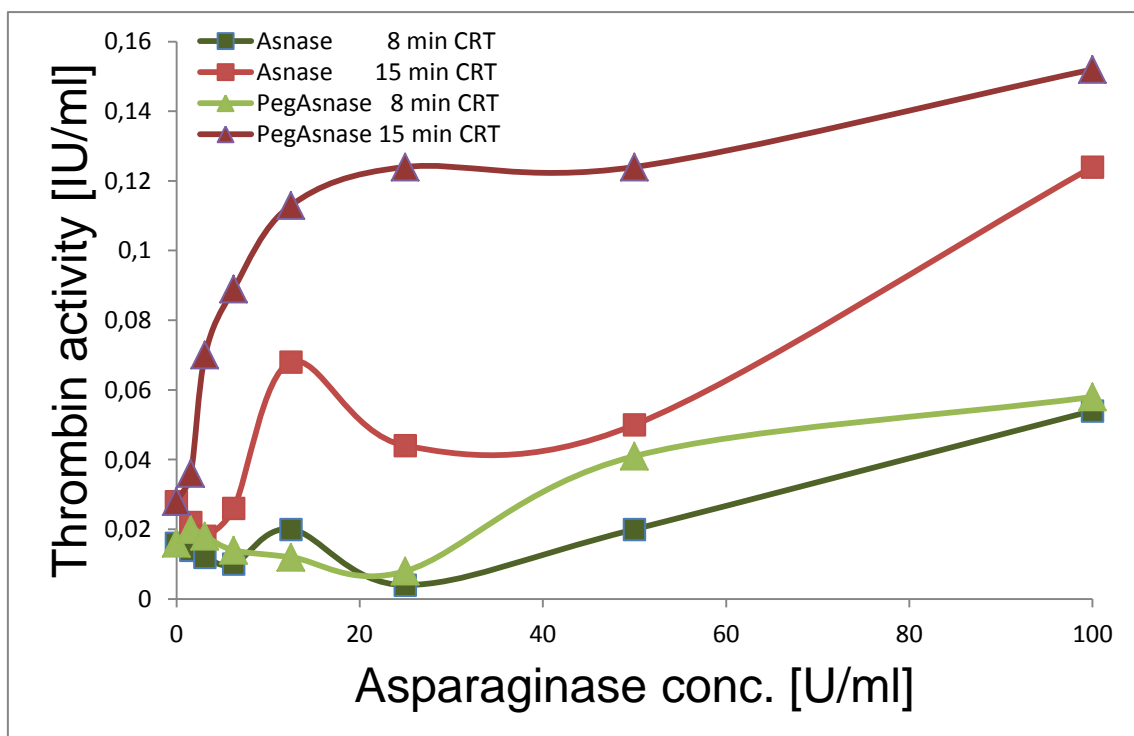


Abbildung 68: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Die approx. SC200 erreichte einen Wert von 10 U/ml Asnase oder 3 U/ml PEG-Asnase.

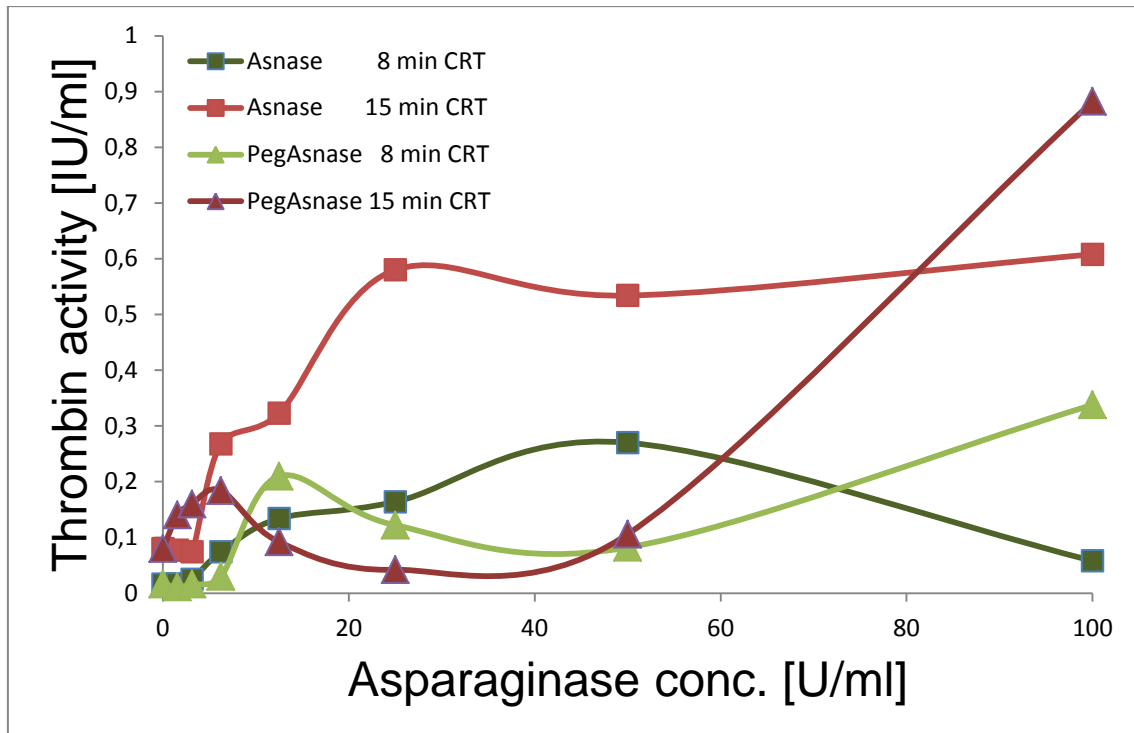


Abbildung 69: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Die approx. SC200 erreichte einen Wert von 4 U/ml Asnase oder 7 U/ml PEG-Asnase.

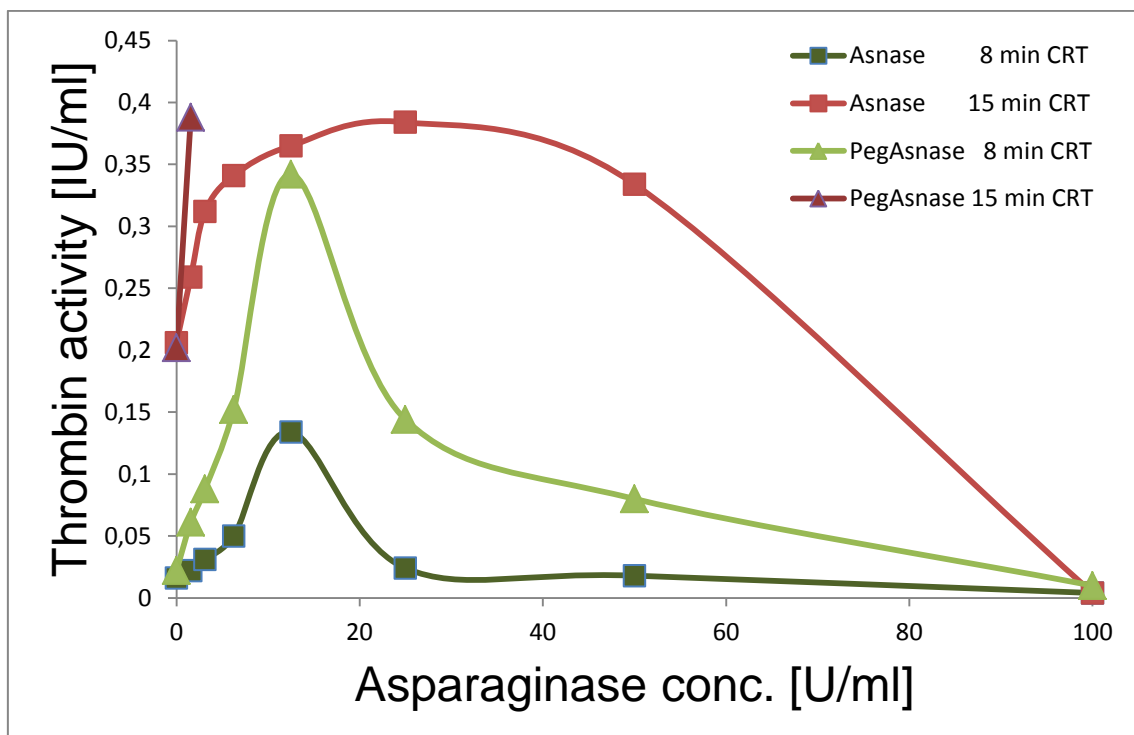


Abbildung 70: Thrombin-Generierung in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Die approx. IC50 lag bei 85 U/ml Asnase oder 96 U/ml PEG-Asnase, die approx. SC200 erreichte einen Wert von 3 U/ml Asnase oder 1 U/ml PEG-Asnase.

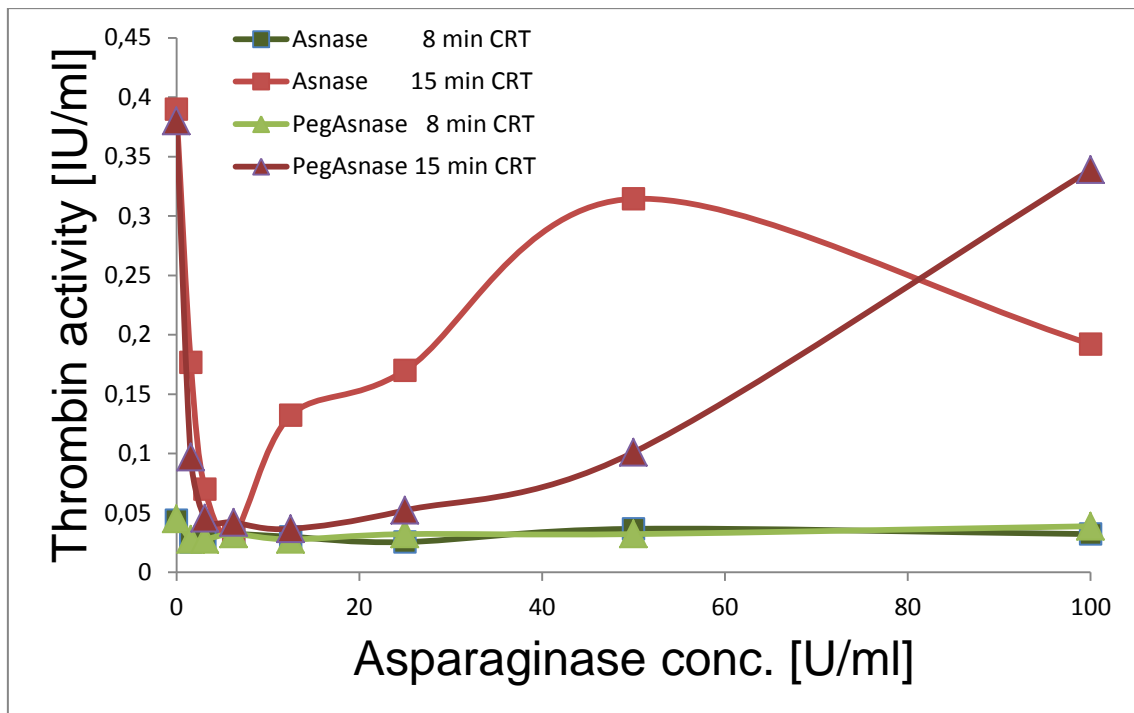


Abbildung 71: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Es ergab sich eine approx. IC₅₀ von 1 U/ml für beide Asparaginasetypen.

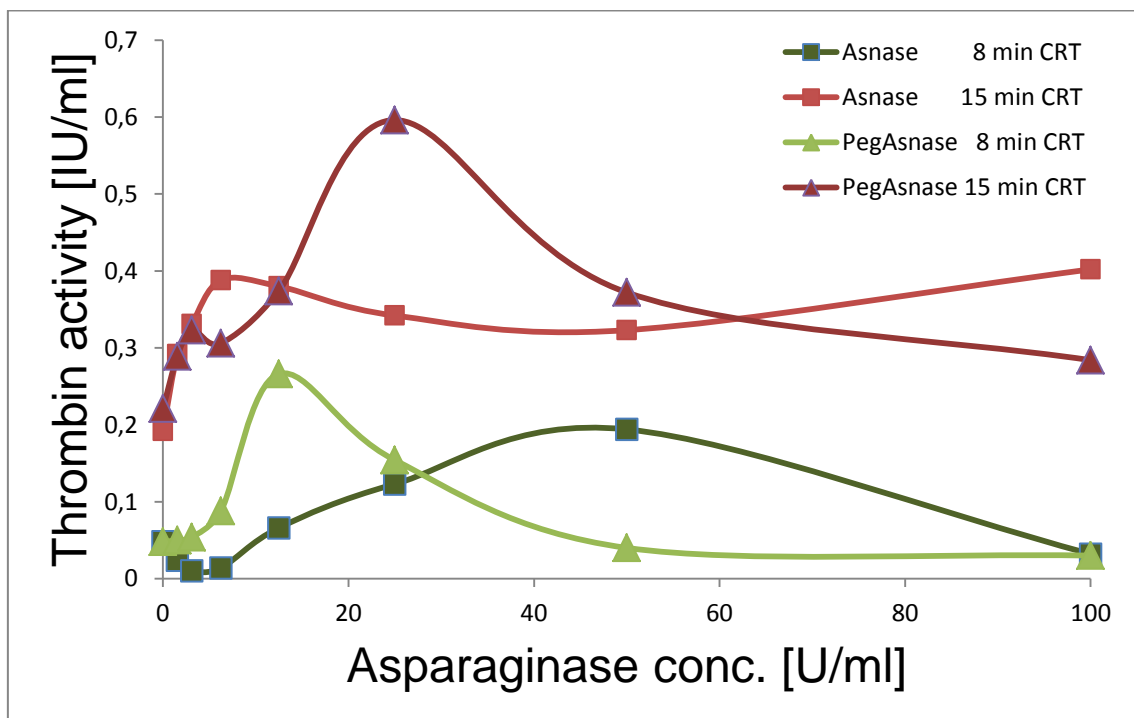


Abbildung 72: Thrombin-Generierung in gepooltem Plasma in Abhängigkeit der Asparaginasekonzentration

Die approx. IC₅₀ lag bei 2 U/ml Asparaginase, die approx. SC₂₀₀ bei 13 U/ml Asnase oder 7 U/ml PEG-Asnase.

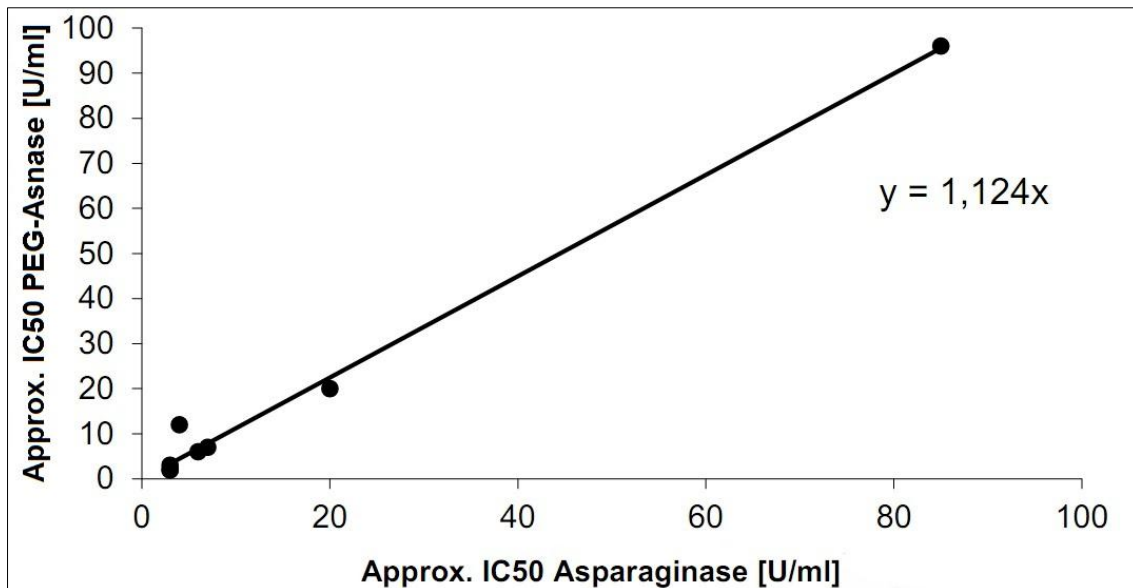


Abbildung 73: Vergleich der Thrombin-Generierung in individuellen normalen Plasmaproben, die mit Asparaginase oder PEG-Asparaginase versetzt wurden

Acht individuelle normale Plasmen mit einem messbaren approx. IC50 für beide Asparaginase-typen wurden verglichen. Die Mittelwerte \pm 1 Standardabweichungen (MV \pm 1 SD) lagen bei 16 ± 28 U/ml Asparaginase und 19 ± 32 U/ml PEG-Asparaginase. Die Werte korrelierten mit einem Wert von $r = 0,995$.

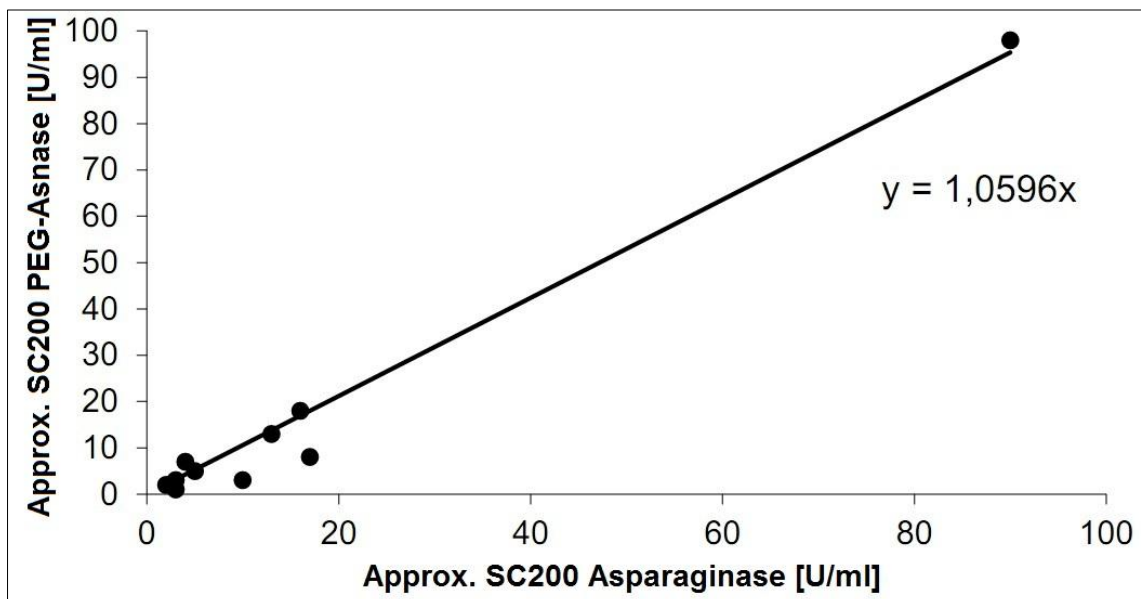


Abbildung 74: Vergleich der Thrombin-Generierung in individuellen normalen Plasmaproben, die mit Asparaginase oder PEG-Asparaginase versetzt wurden

Zehn individuelle normale Plasmen mit einem messbaren approx. SC200 für beide Asparaginasetypen wurden verglichen. Die MV \pm 1 SD lagen bei 16 ± 26 U/ml Asparaginase und 16 ± 29 U/ml PEG-Asparaginase. Die Werte korrelierten mit einem Wert von $r = 0,99$.

4.4 RECA mit Plasmaproben unter Zugabe von nativer *E. coli* Asparaginase und zusätzlicher Gabe von niedermolekularem Heparin

Im letzten Versuchsabschnitt wurde eine gepoolte normale Plasmaprobe mit unterschiedlichen Konzentrationen an niedermolekularem Heparin (Enoxaparin) versetzt und im sofortigen Anschluss mit nativer *E. coli* Asparaginase der alten Charge oder 0,9 % Natriumchloridlösung versehen.

Bei der gepoolten normalen Plasmaprobe, versetzt mit 192 U/ml Asparaginase, wurden annähernd 0,3 IU/ml Thrombin bei einer CRT von 10 Minuten (RECA-10) (Abb. 75) und annähernd 1 IU/ml Thrombin nach 20 Minuten (RECA-20) generiert (Abb. 76). Für diese mit Asparaginase versetzte Probe lag der approx. IC50-Wert bei 0,024 U/ml Enoxaparin (analysiert bei RECA-10). Dieselbe gepoolte Plasmaprobe ohne Zugabe von Asparaginase generierte hingegen eine ungefähre Thrombinmenge von 0,1 IU/ml bei einer CRT von 10 min (RECA-10).

Der IC50-Wert bei der unbehandelten Plasmaprobe lag bei 1 - 2 mIU/ml Enoxaparin.

Auf der nächsten Seite werden die Abbildungen der individuellen Plasmaproben nach Zusatz von 0 bzw. 192 U/ml Asparaginase in Bezug auf ihre Thrombin-Generierung gegenüber der Enoxaparinkonzentration dargestellt.

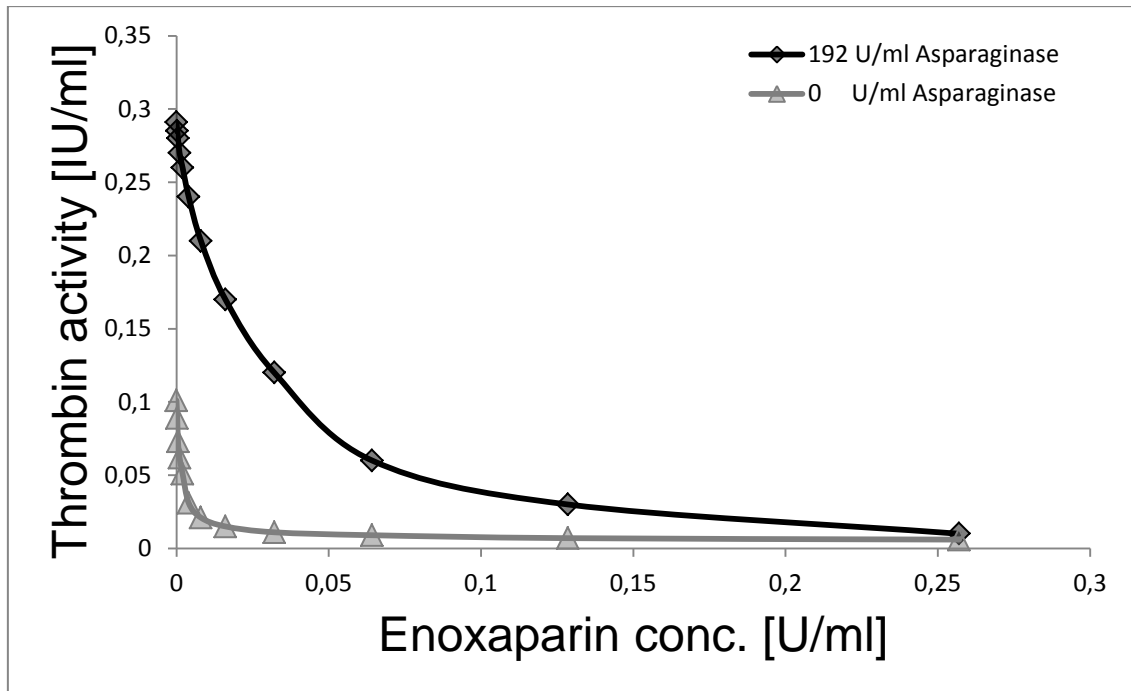


Abbildung 75: Prävention der Asparaginase-induzierten pathologischen Thrombin-Generierung durch LMWH

Gepooltes normales Plasma, versetzt mit 192 U/ml Asparaginase, generierte im RECA-10 eine Menge von ungefähr 0,3 IU/ml Thrombin. Ohne Asparaginasezusatz wurden Werte von 0,1 IU/ml erreicht.

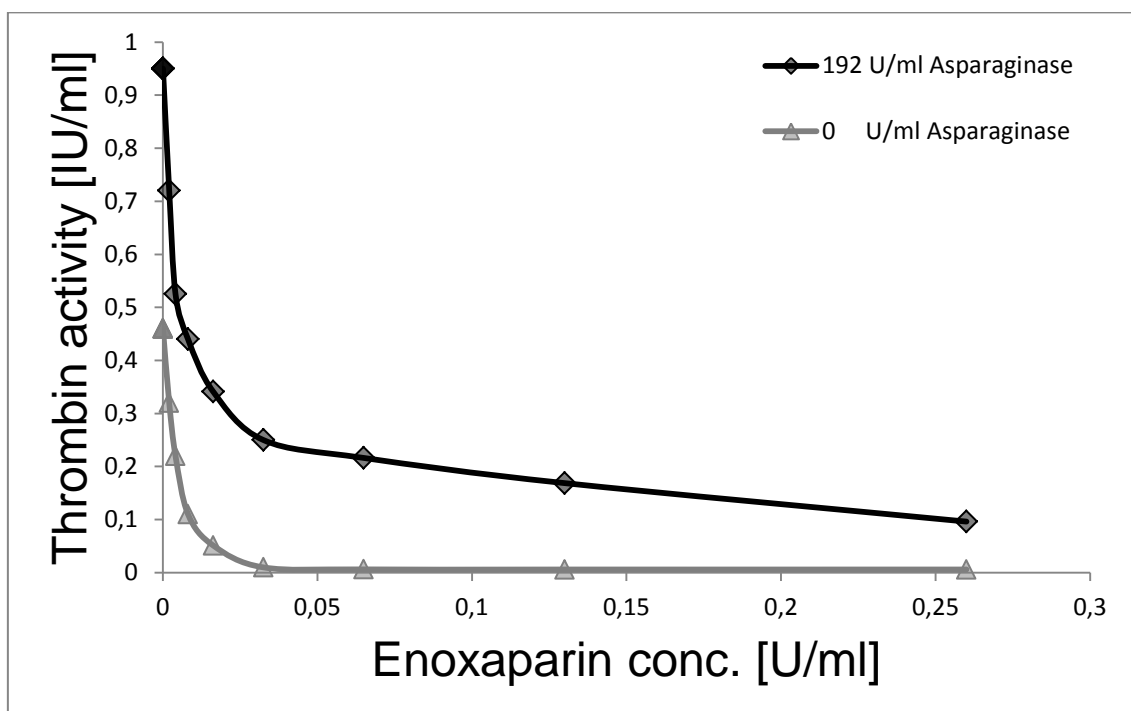


Abbildung 76: Prävention der Asparaginase-induzierten pathologischen Thrombin-Generierung durch LMWH

Gepooltes normales Plasma, versetzt mit 192 U/ml Asparaginase, generierte im RECA-20 eine Menge von ungefähr 0,95 IU/ml Thrombin. Ohne Asparaginasezusatz wurden Werte von 0,46 IU/ml Thrombin erreicht.

5. Diskussion

Die vorliegende laboranalytische Arbeit hatte das Ziel, die durch das Zytostatikum Asparaginase ausgelösten Folgen auf die Hämostase von normalen Plasmen differenziert zu untersuchen.

Asparaginase ist seit Jahren dafür bekannt, die plasmatische Gerinnung zu aktivieren oder zu inaktivieren (Barbui *et al.*, 1993; Alberts, *et al.*, 1999; Barbui & Falanga, 2001).

Allerdings war es bislang nicht möglich, diese plasmatischen Gerinnungsveränderungen mit den herkömmlichen (groben) Tests der klinischen Gerinnungs-Routine bereits in der Frühphase oder *in vitro* vor der Medikamentengabe zu messen.

Nachdem der neue plasmatische Thrombin-Test und die davon abgeleiteten Thrombin-Generierungsteste von Stief etabliert wurden, gibt es endlich den „recalcified coagulation activity assay“ (RECA), ein Thrombin-Generierungstest der neusten Generation, der hochspezifisch und hochsensitiv feinste Veränderungen der plasmatischen Gerinnung erfasst (Stief, 2006a, Stief, 2006b, Stief, 2008c). Mittels RECA wurden nun erstmals differenzierte Gerinnungsbefunde an Asparaginase-supplementierten Normalplasmen gewonnen.

Mit Bestimmung der approx. SC200 und der approx. IC50 konnten die Auswirkungen der jeweiligen Asparaginase auf die Blutgerinnung analysiert werden.

Erstaunlicherweise wurde gefunden, dass das Enzym in individuellen Plasmaproben nicht nur die intrinsische Thrombin-Generierung triggern, sondern auch reduzieren könnte. Manche Plasmen zeigten sogar, abhängig von der Gerinnungs-Reaktions-Zeit, sowohl eine approx. SC200 als auch eine approx. IC50.

Bei der nativen *E. coli* Asparaginase der neuen Charge reagierten 51 % der Plasmaproben mit einer Erhöhung der Thrombin-Generierung, 20 % mit einer Reduzierung und bei 25 % konnte die Thrombin-Generierung sowohl pathologisch ansteigen als auch abfallen, 4 % waren resistent. Das heißt also, dass die native *E. coli* Asparaginase die intrinsischen Faktoren der plasmatischen Gerinnung einerseits aktivieren und

andererseits deaktivieren könnte. Über den genauen Mechanismus, wie die Asparaginase die Gerinnung aktiviert, kann derzeit nur spekuliert werden: es könnte sein, dass sie die Plasma-Matrix verändert und dass dies bei empfindlichen Plasmen Faktor 12 oder Präkallikrein in Faktor 12a oder Kallikrein faltet, wodurch die intrinsische Gerinnung ausgelöst wird. Manche Asparaginasetypen könnten auch kritische Diaminoaminosäuren innerhalb empfindlicher Proteine angreifen, speziell unglykolisierte, unreife Proteine (Shapiro *et al.*, 1980).

Die native *E. coli* Asparaginase der gleichen Produktart, die sich nur in einem älteren Herstellungsdatum unterschied (alte Charge), demonstrierte ein deutlich erhöhtes thrombogenes Potenzial.

Bei der alten Charge ergab sich eine durchschnittliche SC200 von 5 U/ml. Der Durchschnittswert der neuen Charge Asparaginase für die SC200, basierend auf den Proben, die nur eine SC200 aufwiesen, lag bei Konzentrationen von 10 U/ml. Somit würde ein Patient, dessen Plasma prothrombogen auf die Asparaginase wirkt, mit der alten Charge mit steigender Asnasekonzentration viel eher Thrombosen entwickeln als mit der neuen.

Die neue Charge Asparaginase wirkte zwar weniger thrombogen, könnte aber ein Risiko für schwere Blutungen unter der Asparaginase-Therapie darstellen, was die ermittelte IC50 andeuten könnte.

Derzeit befinden sich drei verschiedene Asparaginasepräparationen auf dem Markt (Nowak-Göttl *et al.*, 1997). Die beiden nativen Formen *Escherichia coli* Asparaginase, *Erwinia chrysanthemi* (Albertsen *et al.*, 2001) und die modifizierte Form der nativen *E. coli* Asparaginase die PEG-Asnase (Graham, 2003).

Die *Escherichia coli* Asparaginase scheint die Blutgerinnung mehr zu aktivieren als die *Erwinia chrysanthemi* Asparaginase (Mitchell *et al.*, 1995; Appel *et al.*, 2006). Dennoch besitzt die *E. coli* Asparaginase bei vergleichbar eingesetzten Dosen eine signifikant bessere Wirkung als die *Erwinia chrysanthemi* Asparaginase (Duval *et al.*, 2002).

Mit Einführung der modifizierten Form des Enzyms der PEG-Asparaginase als Alternative zur nativen *E. coli* Asnase wurde versucht, den Hauptnebenwirkungen der Asnase erfolgreich entgegenzuwirken (Ashihara *et*

al., 1978; Park *et al.*, 1981). Durch Pegylierung des nativen Enzyms wurde die immunogene Wirkung herabgesetzt und die Halbwertszeit verlängert (wodurch es seltener in niedrigerer Dosierung eingesetzt werden muss), wobei die Asparaginaseaktivität unverändert blieb (Harris & Chess, 2003; Rytting, 2010).

Im Juli 2006 wurde die PEG-Asparaginase in den USA für die Erstlinienbehandlung von Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie zugelassen und wird in der Therapie der ALL der nativen *E. coli* Asnase eindeutig bevorzugt (Dinndorf *et al.*, 2007).

Der durchgeführte dritte Versuchsteil, in dem die PEG-Asnase mit der nativen Asparaginase verglichen wurde, zeigte jedoch keinen Vorteil in der Anwendung der teureren pegylierten Form des Enzyms, in Anbetracht der Auswirkungen auf die Thrombin-Generierung. Die approximativen SC200- und IC50-Werte korrelierten mit einem Korrelationskoeffizienten von größer 0,9, wobei sich die jeweiligen SC200- und IC50-Werte entsprachen. Von Seiten unserer hochempfindlichen Blutgerinnungsdaten gibt es daher keinen Grund, die wesentlich teurere PEG-Asparaginase den hier im klinischen Alltag verwendeten nativen *E. coli* Asparaginasen vorzuziehen (Veronese & Mero 2008; Zeidan *et al.*, 2009).

Individuen mit Hämostase-Resistenz gegenüber Asparaginase tolerieren viel höhere Dosen an Asparaginase als die, die man normalerweise zur Therapie verwenden würde. Mit Hilfe des RECA könnten solche Individuen identifiziert werden, damit sie aggressiver behandelt werden könnten, um so ihre Erkrankung erfolgreicher zu bekämpfen.

Asparaginase wird für gewöhnlich als Teil einer Kombinationschemotherapie mit anderen Medikamenten zur Induktion einer Remission in ALL-Patienten verabreicht. Sie ist zu einem essentiellen Bestandteil in fast allen pädiatrischen ALL-Behandlungsprotokollen geworden.

In der heutigen Tumorthherapie wird der Onkologe oft mit verschiedenen Gerinnungsproblemen von Patienten konfrontiert, die mit Zytostatika behandelt werden. Gerade in der Kombinationstherapie von Tumoren, wo verschiedene Zytostatika und andere Medikamente zum Einsatz kommen, ist es oft nicht möglich, während der Therapie nur ein bestimmtes

Medikament im Hinblick auf die Gerinnungsproblematik zu untersuchen (Athale & Chan, 2003).

Der RECA ist ein interessanter Test, um das Reaktionsvermögen des Blutgerinnungssystems eines individuellen Patienten gegenüber jedem Medikament vorherzusagen (Stief, 2009). Es ist anzuraten, die individuelle pro-/antithrombogene Empfindlichkeit gegenüber dem bakteriellen Enzym vor Beginn der Zytostatikatherapie zu diagnostizieren, auch in Bezug auf die Prophylaxe von thrombembolischen Komplikationen.

Prokoagulatorische Patienten sollten deshalb mit einer prophylaktischen bis therapeutischen Gabe von niedermolekularem Heparin behandelt werden (Payne & Vora, 2007; Stief *et al.*, 2008b).

Während und vor dem Therapieverlauf der Asparaginase wird angeraten, verschiedene Kontrolluntersuchungen durchzuführen, einschließlich der hochinnovativen Gerinnungsdiagnostik. Initial sollten nach der Therapie bis zur Normalisierung häufig Kontrollen des Blutbildes, der Elektrolyte, der harnpflichtigen Substanzen (Mikrothromben in den Glomerula zeigen oft eine beginnende pathologische disseminierte intravaskuläre Gerinnung an), des Blut-/Harnzuckers, der Gerinnung und anderer Enzyme durchgeführt werden (Piatkowska-Jakubas *et al.*, 2008).

Es wird zwar ein Drug Monitoring empfohlen, in der die Asnasespiegel überwacht werden und die Asnaseaktivität mit den unterschiedlichsten Methoden bestimmt werden kann (Boos *et al.*, 1996; Lanvers-Kaminsky, 2006), allerdings gibt es noch keinen Test, der die Auswirkungen der Asnase auf die Blutgerinnung des Patienten vor und während der Therapie individuell bestimmt, ihn risikostratifiziert und daraufhin dementsprechende Maßnahmen wie eine individuelle Dosisanpassung oder eine prophylaktische Gabe von NMH erlaubt.

In der Therapie wird die Asparaginase in einer Dosierung von 200 unit pro Kilogramm (U/kg), was einer Konzentration von 6000 U/m^2 entspricht, verabreicht. Die Dosierung kann auf 1000 U/kg, über 1500 U/kg oder noch höheren Dosen gesteigert werden. Die dazugehörigen errechneten Plasmaaktivitäten würden bei 5 U/ml, 25 U/ml oder $> 25 \text{ U/ml}$ liegen (Athale & Chan, 2003). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegende Arbeit beweist, dass es möglich ist, den Blutgerinnungsstatus

eines individuellen Patienten in Bezug auf die folgende Asparaginasegabe in vitro festzustellen. Man könnte dem Patienten vor der Therapie gegen ALL oder NHL Plasmaproben entnehmen, sie in vitro mit dem jeweiligen Asparaginasepräparat in unterschiedlichen Konzentrationen versetzen und anschließend analysieren, welche Auswirkungen sie auf den Patienten ausüben. Mit solch einem Test könnte die individuelle Antwort des Gerinnungssystems eines Patienten auf jedes Medikament im Voraus überblickt werden, was derzeit nicht möglich ist (Payne & Vora, 2007).

Es bestünde die Möglichkeit, Patienten mit einem Risiko für pathologisch gesteigerte oder pathologisch abfallende plasmatische Thrombin-Generierung, die in Thrombosen und Blutungen enden können, vor der Zytostatikatherapie zu identifizieren und dementsprechend entgegenzusteuern.

Patienten mit einem erhöhten Risiko für Asparaginase-induzierte Thrombosen könnten mit prophylaktischen bis therapeutischen Dosen an niedermolekularen Heparinen vorbehandelt werden. Eine prophylaktische Dosis $> 0,2$ IU/ml wäre angebracht, eventuell in Kombination mit Antithrombin 3 (Gugliotta, *et al.*, 1990). Die individuelle adäquate Dosis Enoxaparin könnte mit dem EXCA (extrinsic coagulation activity assay) bestimmt werden. Ein Zielwert von ca. 20 % der EXCA-Norm wäre hierbei von hohem klinischem Interesse (Stief, 2008; Stief, 2012b).

Darüber hinaus kann mit Bestimmung der IC₅₀/SC₂₀₀-Konzentrationen die maximal tolerable Dosis der Asparaginase in vivo bestimmt werden, die dem Patienten während der Therapie problemlos verabreicht werden könnte.

Wenn mehrere unterschiedliche Asparaginasepräparate zur Verfügung stehen, sollte man sich darüber Gedanken machen, welches Präparat man einsetzt. Der behandelnde Arzt könnte eine Präparation bevorzugen, die nur eine leichte Steigerung der Thrombin-Generierung auslöst, im Gegensatz zu einer, die zu drastischen Anstiegen der Thrombin-Generierung führt. Zudem sollte beim Wechsel von einer alten auf eine neue Charge Asparaginase der Gerinnungsstatus und die zu verabreichende Dosis unbedingt kontrolliert werden, da sich markante

Unterschiede zwischen den beiden hier untersuchten nativen *E. coli* Asparaginasepräparaten gleicher Produktart zeigten.

Perspektivisch ist folglich zu empfehlen, die individuelle Antwort eines Patienten auf eine bestimmte Asparaginasepräparation vor und während seiner Therapie durch den hier beschriebenen RECA Test zu analysieren. Somit könnte zukünftig die Therapie individuell auf die Patientenbedürfnisse abgestimmt und eine Verbesserung des Therapieergebnisses erzielt werden.

6. Zusammenfassung

Das bakterielle Enzym Asparaginase ist ein sehr effektives Zytostatikum in der Therapie lymphoproliferativer Erkrankungen. Die Eigenschaft des Enzyms, die plasmatische Blutgerinnung zu verändern, ist eine bekannte klinische Komplikation. Nebenwirkungen der Asparaginase können sowohl Blutungen als auch disseminierte intravaskuläre Thrombosen sein.

Das Ziel der vorliegenden laboranalytischen Arbeit war es, die Auswirkungen unterschiedlicher Asparaginasen auf die plasmatische intrinsische Thrombin-Generierung in 118 individuellen normalen Plasmaproben mittels eines neuen hochsensitiven, hochspezifischen Thrombin-Generierungstests, dem „recalcified coagulation activity assay“ (RECA) zu bestimmen.

Für die Versuche wurden drei verschiedene Asparaginasen verwendet; zwei native *E. coli* Asparaginasen, die sich nur in ihrem Herstellungsdatum unterschieden (alte Charge/neue Charge) und eine modifizierte Form der Asparaginase, die Polyethylenglykol (PEG)-Asparaginase, eine *E. coli* Asparaginase gekoppelt an Polyethylenglykol.

Mit Hilfe des RECA wurden die Auswirkungen (besonders die prothrombotische) der jeweiligen Asparaginasepräparation auf die plasmatische Gerinnung ermittelt. Dafür wurde für jedes normale Plasma die approximative 200 % stimulatory concentration (approx. SC200) oder die approximative 50 % inhibitory concentration (approx. IC50) bestimmt.

Die approx. SC200 ist die Asparaginasekonzentration, bei der 200 % der Thrombin-Generierung von unsupplementiertem Plasma erreicht werden.

Die approx. IC50 ist die Asparaginase-Konzentration, bei der nur noch 50 % der Thrombin-Generierung von unsupplementiertem Plasma erreicht werden.

Die supplementierten Plasmen verhielten sich prokoagulatorisch, antikoagulatorisch oder Gerinnungs-resistent hinsichtlich der Hämostasemodulierenden Eigenschaft der Asparaginase. Bei der alten Charge Asparaginase zeigten alle Proben uneingeschränkt ein prothrombotisches Verhalten mit approx. SC200-Werten von $5,8 \pm 5,4$ U/ml (Mittelwert \pm 1 Standardabweichung; Bereich: 1 - 25 U/ml).

Im Gegensatz dazu demonstrierten bei der neuen Charge nur 51 % der untersuchten Plasmen ein prothrombotisches Verhalten, 24,5 % besaßen eine Kombination aus IC50 und SC200 (abhängig von der Gerinnungs-Reaktions-Zeit), 21 % der Proben verfügten über eine alleinige IC50 (Mittelwert = 6 U/ml) und 3,5 % der Plasmen erwiesen sich als gerinnungs-modulationsresistent.

Dies bedeutet, dass die neue Charge Asparaginase im Vergleich zur alten weniger thrombogen wirkt. Hingegen deuten die ermittelten IC50-Werte jedoch an, dass die neue Charge empfindliche Plasmen stark antikoagulieren könnte.

Die PEG-Asparaginase als modifizierte Form der nativen *E. coli* Asparaginase wird als weniger nebenwirkungsreich beschrieben. Hinsichtlich der Gerinnung ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der nativen *E. coli* Asparaginase und der PEG-Asparaginase. Beide modulierten gleichermaßen die Gerinnung. Die approx. SC200-Werte von beiden Asparaginasen korrelierten mit einem Korrelationskoeffizienten größer 0,9. Diese hohe Korrelation und die ähnlichen Durchschnittswerte verdeutlichen, dass sich die (teurere) PEG-Asparaginase bezüglich der plasmatischen Thrombin-Generierung ähnlich wie die native *E. coli* Asparaginase verhielt.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Hämostase-System jedes Patienten individuell empfindlich auf die jeweilige Asparaginasepräparation reagiert. Mit Hilfe des RECA kann die individuelle prothrombotische Antwort des intrinsischen Gerinnungssystems jedes einzelnen Patienten auf Asparaginase vor Gabe bestimmt werden. Es sollte der differenzierte Gerinnungsstatus des individuellen Patienten und seine Veränderung durch Asparaginase in vitro vor und während der Therapie ermittelt werden. So kann insbesondere eine prokoagulatorische Tendenz des Zytostatikums auf das Patientenplasma diagnostiziert werden. Dies erlaubt vor Asparaginase-Gabe Risikopatienten zu erkennen und ggf. mit niedermolekularem Heparin prophylaktisch stärker entgegenzusteuern.

7. Literaturverzeichnis

- Abuchowski, A., Van Es, T., Palczuk, T., Mc Coy, J.R. & Davis, F.F. (1979). "Treatment of L5178Y tumor-bearing BDF1 mice with a nonimmunogenic L-glutaminase-L-asparaginase." Cancer Treat Rep **63**(6): 1127-1132.
- Aghaiypour, K., Wlodawer, A. & Lubkowski, J., (2001). "Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase." Biochemistry **40**(19): 5655-5664.
- Aguayo, A., Cortes, J., Thomas, D., Pierce, S., Keating, M. & Kantarjian, H. (1999). "Combination therapy with methotrexate, vincristine, polyethylene-glycol conjugated-asparaginase, and prednisone in the treatment of patients with refractory or recurrent acute lymphoblastic leukemia." Cancer **86**(7): 1203-1209.
- Ahmad, S.S., Rawala-Sheikh, R. & Walsh, P.N. (1992). "Components and assembly of the factor X activating complex." Thromb Hemost **18**(3): 311-323.
- Alberts, S.R., Bretscher, M., Wiltsie, J.C., O'Neill, B.P., Mokri, B. & Witzig, T.E. (1999). "Thrombosis related to the use of L-asparaginase in adults with acute lymphoblastic leukemia: a need to consider coagulation monitoring and clotting factor replacement." Leuk Lymphoma **32**(5-6): 489-496.
- Albertsen, B.K., Schrøder, H., Ingerslev, J., Jakobsen, P., Avramis, V.I., Müller, H.J., Carlsen, N.T. & Schmiegelow, K. (2001). "Comparison of intramuscular therapy with *Erwinia* asparaginase and asparaginase Medac: pharmacokinetics, pharmacodynamics, formation of antibodies and influence on the coagulation system." Br J Haematol **115**(4): 983-990.
- Altenbern, R.A. & Housewright, R.D., (1954). "Stereospecific asparaginases in smooth *Brucella abortus*, strain 19." Arch Biochem Biophys **49**(1): 130-137.

- Amylon, M.D., Shuster, J., Pullen, J., Berard, C., Link, M.P., Wharam, M., Katz, J., Yu, A., Ravindranath, Y., Kurtzberg, J., Desai, S., Camitta, B. & Murphy, S.B. (1999). "Intensive high-dose L-asparaginase improves survival for pediatric patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia and advanced stage lymphoblastic lymphoma: a Pediatric Oncology Group study." Leukemia **13**(1): 335-342.
- Anderson, N., Lokich, J.J. & Tullis, J.L. (1979). "L-asparaginase effect on antithrombin-III levels." Med Pediatr Oncol **7**(4): 335-340.
- Appel, L.M., Hop, W. & Pieters, R. (2006). "Changes in hypercoagulability by asparaginase: a randomized study between two asparaginases." Blood Coagul Fibrinolysis **2**(17): 139-146.
- Arbogast, H.P. (2004). "Thrombin: antithrombotic properties and pharmacological consequences." Hämostaseologie **24**(3): 179-190.
- Ashihara, Y., Kono, T., Yamazaki, S. & Inada, Y. (1978). "Modification of *E. coli* L-asparaginase with polyethylene glycol: disappearance of binding ability to anti-asparaginase serum." Biochem Biophys Res Commun **83**(2): 385-391.
- Asselin, B.L., Sallan, S. & Gelber, R. (1993a). "Relative toxicity of *E. coli* Asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia." Medical and Pediatric Oncology **33**(1): 556.
- Asselin, B.L., Whitin J.C., Coppola, D.J., Rupp, I.P., Sallan, S.E. & Cohen, H.J. (1993b). "Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations." J Clin Oncol **11**(9): 1780-1786.
- Asselin, B.L. (1999). "The three asparaginases. Comparative pharmacology and optimal use in childhood leukemia." Adv Exp Med Biol **457**: 621-629.
- Athale, U.H. & Chan, A.K. (2003). "Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. Part II. Pathogenesis of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia: effects of the disease and therapy." Thromb Res **111**(4-5): 199-212.

- Avramis, V.I., Sencer, S., Periclou, A.P., Sather, H., Bostrom, B.C., Cohen, L.J., Ettinger, A.G., Ettinger, L.J., Franklin, J., Gaynon, P.S., Hilden, J.M., Lange, B., Majlessipour, F., Mathew, P., Needle, M., Neglia, J., Reaman, G., Holcenberg, J.S. & Stork, L. (2002). "A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study." Blood **99**(6): 1986-1994.
- Avramis, V.I. & Panosyan, E. (2005). "Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future." Clin Pharmacokinet **44**(4): 367-393.
- Avramis, V.I. & Tiwari, P.N. (2006). "Asparaginase (native Asnase or pegylated Asnase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia." Int J Nanomedicine **1**(3): 241-254.
- Baglia, F.A. & Walsh, P.N. (1998). "Prothrombin is a cofactor for the binding of factor XI to the platelet surface and for platelet-mediated factor XI activation by thrombin." Biochemistry **37**(8): 2271-2281.
- Baker, D. C. & Brassard, J. (2011). "Review of Continuing Education Course on Hemostasis." Toxicol Pathol **39**(1): 281-288
- Barbui, T., Finazzi, G., Falanga, A., Battista, R. & Bassan, R. (1993). "Bleeding and thrombosis in acute lymphoblastic leukemia." Leuk Lymphoma **11**(2): 43-47.
- Barbui, T. & Falanga, A. (2001). "Disseminated intravascular coagulation in acute leukemia." Semin Thromb Hemost **27**(6): 593-604.
- Bick, R. L. & Murano, G. (1994). "Physiology of hemostasis." Clin Lab Med **14**(4): 677-707.
- Boos, J., G. Werber, Ahlke, E., Schulze-Westhoff, P., Nowak-Göttl, U., Wurthwein, G., Verspohl, E.J., Ritter, J. & Jürgens, H. (1996). "Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations." Eur J Cancer **32**(9): 1544-1550.

- Broome, J.D. (1963a). "Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects I." J Exp Med **118**: 99-120.
- Broome, J.D. (1963b). "Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects II." J Exp Med **118**: 121-148.
- Broome, J.D. (1965). "Antilymphoma activity of L-asparaginase in vivo: clearance rates of enzyme preparations from guinea pig serum and yeast in relation to their effect on tumor growth." J Natl Cancer Inst **35**(6): 967-974.
- Brueck, M., Koerholz, D., Nuernberger, W., Juergens, H., Goebel, U. & Wahn, V. (1989). "Elimination of L-asparaginase in children treated for acute lymphoblastic leukemia." Dev Pharmacol Ther **12**(4): 200-204.
- Butenas, S., Van 't Veer, C., Cawthern, K., Brummel, K.E. & Mann, K.G. (2000). "Models of blood coagulation." Blood Coagul Fibrinolysis **11**(1):9-13.
- Campbell, H.A., Mashburn, L.T., Boyse, E. & Old, J.L. (1967). "Two L-asparaginases from *Escherichia coli* B, their separation, purification and antitumor activity." Biochemistry **6**(3): 721-730.
- Campbell, H.A. & Mashburn, L.T. (1969). "L-Asparaginase EC-2 from *Escherichia coli*. Some substrate specificity characteristics." Biochemistry **8**(9): 3768-3775.
- Capizzi, R.L., Bertino, J.R., Skeel, R.T., Creasey, W.A., Zanes, R., Olayon, C., Peterson, R.G. & Handschumacher, R.E. (1971). "L-asparaginase: clinical, biochemical, pharmacological, and immunological studies." Ann Intern Med **74**(6): 893-901.
- Capizzi, R.L. (1974). "Schedule dependent synergism and antagonism between methotrexate and L-asparaginase." Biochemical Pharmacology **23**(Suppl 2): 151-161.
- Capizzi, R.L. (1975). "Improvement in the therapeutic index of methotrexate by L-Asparaginase." Cancer Chem Rep **6**: 37-41.

- Carlsson, H., Stockelberg, D., Tengborn, L., Braide, L., Carneskog, J. & Kutti, J. (1995). "Effects of *Erwinia*-asparaginase on the coagulation system." Eur J Haematol **55**(5): 289-293.
- Castaman, G. & Rodeghiero, F. (1993). "*Erwinia*- and *E. coli*-derived L-asparaginase have similar effects on hemostasis. Pilot study in 10 patients with acute lymphoblastic leukemia." Haematologica **78**(6 Suppl 2): 57-60.
- Chu, A.J. (2010). "Blood coagulation as an intrinsic pathway for proinflammation: a mini review." Inflamm Allergy Drug Targets **9**(1): 32-44.
- Clarkson, B., Krakoff, L., Burchenal, J., Karnofsky, D., Golbey, R., Dowling, M., Oettgen, H. & Lipton, A. (1970). "Clinical results of treatment with *E. coli* L-asparaginase in adults with leukemia, lymphoma, and solid tumors." Cancer **25**(2): 279-305.
- Clavell, L.A., Gelber, L.D., Cohen, H.J., Hitchcock-Bryan, S., Cassady, J.R., Tarbell, N.J., Blattner, S.R., Tantravahi, R., Leavitt, P. & Sallan, S.E. (1986). "Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med **315**(11): 657-663.
- Clementi, A. (1922). "La desamidation enzymatique de L-Asparaginase chez les differentes especes animales et la signification physiologique de sa presence dans l'organiasma." Arch Int Physiol **19**(1): 369-376.
- Cochrane, C.G. & Griffin, J.H. (1982). "The biochemistry and pathophysiology of the contact system of plasma." Adv Immunol **33**: 241-306.
- Cooney, D.A. & Handschumacher, R.E. (1970). "L-asparaginase and L-asparagine metabolism." Annu Rev Pharmacol **10**: 421-440.
- Crowther, D. (1971). "L-asparaginase and human malignant disease." Nature **229**: 168-171.
- Davie, E.W. (2003). "A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation." J Biol Chem **278**(51): 50819-50832.

- Davie, E.W. & Kulman, J.D. (2006). "An overview of the structure and function of thrombin." Semin Thromb Hemost **32** (Suppl 1): 3-15.
- Davis, F.F., Kazo, G.M., Nucci, M.L. & Abuchowski, A. (1991). "Reduction of immunogenicity and extension of circulating half-life of peptides and proteins." In: Lee VHL, editor. Peptide and protein drug delivery, New York.: 831-851.
- Dellinger, C.T. & Miale, T.D. (1976). "Comparison of anaphylactic reactions to asparaginase derived from *Escherichia coli* and from *Erwinia* cultures." Cancer **38**(4): 1843-1846.
- De Loach, J.R., Andrews, K., Satterfield, W. & Keeling, M. (1990). "Intraperitoneal administration of carrier erythrocytes in dogs: an improved method for delivery of L-asparaginase." Biotechnol Appl Biochem **12**(3): 331-335.
- Desai, S.J., Barr, R.D. Andrew, M., De Veber, L.L. & Pai, M.K. (1989). "Management of Ontario children with acute lymphoblastic leukemia by the Dana-Farber Cancer Institute protocols." CMAJ **141**(7): 693-697.
- Desai, S.J., Amylon, M., Schwenn, M., Laver, M.R., Shuster, J. & Murphy, S. (1997). "Outcome of advanced stage III-IV lymphoblastic Non-Hodkin's lymphoma - a pediatric Oncology Group (POG) study." Med. Pediatric. Oncol **29**(1): 0-140.
- Dibenedetto, S.P., Di Cataldo, A., Ragusa, R., Meli, C. & Lo Nigro, L. (1995). "Levels of L-asparagine in CSF after intramuscular administration of asparaginase from *Erwinia* in children with acute lymphoblastic leukemia." J Clin Oncol **13**(2): 339-344.
- Dinndorf, P.A., Gootenberg, J. Cohen, M.H., Keegan, P. & Pazdur, R. (2007). "FDA drug approval summary: pegaspargase (oncaspar) for the first-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL)." Oncologist **12**(8): 991-998.
- Distasio, J.A., Niederman, R.A., Kafkewitz, D. & Goodman, D. (1976). "Purification and characterization of L-asparaginase with anti-lymphoma activity from *Vibrio succinogenes*." J Biol Chem **251**(22): 6929-6933.

- Douer, D., Cohen, L.J. & Periclou, L.A. (1997). "Pharmacokinetic and clinical response in newly diagnosed adults with acute lymphoblastic leukemia (ALL) treated with multiagent chemotherapy." Blood **90**: 334a.
- Douer, D., Yampolsky, H., Cohen, L.J., Watkins, K., Levine, A.M., Periclou, A.P. & Avramis, V.I. (2007). "Pharmacodynamics and safety of intravenous pegaspargase during remission induction in adults aged 55 years or younger with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia." Blood **109**(7): 2744-2750.
- Douketis, J.D., Berger, P.B., Dunn, A.S., Jaffer, A.K., Spyropoulos, A.C., Becker, R.C. & Ansell, J. (2008). "The perioperative management of antithrombotic therapy: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)." Chest **133**(6): 299-339.
- Duval, M., Suci, S., Ferster, A. et al. (2002). "Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial." Blood **99**(8): 2734-2739.
- Eden, O.B., Shaw, M.P., Lilleyman, J.S. & Richards, S. (1990). "Non-randomised study comparing toxicity of *Escherichia coli* and *Erwinia* asparaginase in children with leukaemia." Med Pediatr Oncol **18**(6): 497-502.
- Elhasid, R., Lanir, N., Sharon, R. et al. (2001). "Prophylactic therapy with enoxaparin during L-asparaginase treatment in children with acute lymphoblastic leukemia." Blood Coagul Fibrinolysis **12**(5): 367-370.
- Elliott, M.A., Wolf, R.C., Hook, C.C. et al. (2004). "Thromboembolism in adults with acute lymphoblastic leukemia during induction with L-asparaginase-containing multi-agent regimens: incidence, risk factors, and possible role of antithrombin." Leuk Lymphoma **45**(8): 1545-1549.
- Ertel, L.J., Nesbit, M.E., Hammond, D., Weiner, J. & Sather, H. (1979). "Effective dose of L-asparaginase for induction of remission in previously treated children with acute lymphocytic leukemia: a

- report from Childrens Cancer Study Group." Cancer Res **39**(10): 3893-3896.
- Ettinger, L.J., Kurtzberg, J., Voute, P.A., Jürgens, H. & Halpern, S.L. (1995). "An open-label, multicenter study of polyethylene glycol-L-asparaginase for the treatment of acute lymphoblastic leukemia." Cancer **75**(5): 1176-1181.
- Evans, W.E., Tsiatis, A., Rivera, G., Murphy, S.B., Dahl, G.V., Denison, M., Crom, W.R., Barker, L.F. & Mauer, A.M. (1982). "Anaphylactoid reactions to *Escherichia coli* and *Erwinia* asparaginase in children with leukemia and lymphoma." Cancer **49**(7): 1378-1383.
- Fischer, B.E., Schlokot, U., Mitterer, A., Grillberger, L., Reiter, M., Mundt, W., Dorner, F. & Eibl, J. (1996). "Differentiation between proteolytic activation and autocatalytic conversion of human prothrombin. Activation of recombinant human prothrombin and recombinant D419N-prothrombin by snake venoms from *Echis carinatus* and *Oxyuranus scutellatus*." Protein Eng **9**(10): 921-926.
- Fu, C.H. & Sakamoto, K.M. (2007). "PEG-asparaginase." Expert Opin Pharmacother **8**(12): 1977-1984.
- Gailani, D. & Broze, G.J.(1991). "Factor XI activation in a revised model of blood coagulation." Science **253**(5022): 909-912.
- Gailani, D. & Broze, G.J. (1993a). "Effects of glycosaminoglycans on factor XI activation by thrombin." Blood Coagul Fibrinolysis **4**(1): 15-20.
- Gailani, D. & Broze, G.J. (1993b). "Factor XI activation by thrombin and factor XIa." Semin Thromb Hemost **19**(4): 396-404.
- Gailani, D. (2000). "Activation of factor IX by factor XIa." Trends Cardiovasc Med **10**(5): 198-204.
- Gailani, D. (2007). "The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thrombembolic disease?" Journal of Thrombosis and Haemostasis **5**(06): 1106-1112.
- Gaynon, P.S., Trigg, M.E., Heerema, N.A., Sensel, M.G., Sather, H.N., Hammond, G.D. & Bleyer, W.A. (2000). "Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995." Leukemia **14**(12): 2223-2233.

- Gentry, P.A. (2004). "Comparative aspects of blood coagulation." Vet J **168**(3): 238-251.
- George, J.N. (2000). "Platelets." Lancet **355**(9214):1531-9.
- Gokbuget, N. & Hoelzer, D. (2002). "Recent approaches in acute lymphoblastic leukemia in adults." Rev Clin Exp Hematol **6**(2): 114-141; discussion 200-112.
- Goldberg, J.M, Silverman, L.B., Levy, D.E. et al. (2003). "Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience." J Clin Oncol **21**(2): 3616-3622.
- Goodsell, D.S. (2005). "The molecular perspective: L-asparaginase." Oncologist **10**(3): 238-239.
- Gorr, G. & Wagner, J. (1932). "Über das Amidspaltungsvermögen der Hefen." Biochem Z **254**: 1-4.
- Graham, M.L. (2003). "Pegaspargase: a review of clinical studies." Adv Drug Deliv Rev **55**(10): 1293-1302.
- Greenberg, C.S. & Miraglia, C.C. (1985). "The effect of fibrin polymers on thrombin-catalyzed plasma factor XIIIa formation." Blood **66**(2): 466-469.
- Grover, C.E. & Chibnall, A.C. (1927). "The enzymatic deamination of asparagine in the higher plants." Biochem J **21**: 857-868.
- Gugliotta, L., D'Angelo A., Mattioli Belmonte, M., Vigano-D'Angelo, S., Colombo, G., Catani, L., Gianni, L., Lauria, F. & Tura, S. (1990). "Hypercoagulability during L-asparaginase treatment: the effect of antithrombin III supplementation in vivo." Br J Haematol **74**(4): 465-470.
- Gugliotta, L., Mazzucconi, M.G., Leone, G., Mattioli-Belmonte, M., Defazio, D., Annino, L., Tura, S. & Mandelli, F. (1992). "Incidence of thrombotic complications in adult patients with acute lymphoblastic leukaemia receiving L-asparaginase during induction therapy: a retrospective study. The GIMEMA Group." Eur J Haematol **49**(2): 63-66.

- Haley, E., Fischer, G. & Welch, A. (1961). "The requirement for L-asparaginase of mouse leukemic cell L-5178y in culture." Cancer Res **21**: 532-533.
- Hall, J.G. (1970). "The partitioning of L-asparaginase between blood and lymph." Recent Results Cancer Res **33**: 75-80.
- Halton, J.M., Mitchell, L.G., Vegh, P., Eves, M. & Andrew, M.E. (1994). "Fresh frozen plasma has no beneficial effect on the hemostatic system in children receiving L-asparaginase." Am J Hematol **47**(3): 157-161.
- Hann, L., Vora, A., Richards, S., Hill, F., Gibson, B., Lilleyman, J., Kinsey, S., Mitchell, C. & Eden, O.B. (2000). "Benefit of intensified treatment for all children with acute lymphoblastic leukaemia: results from MRC UKALL XI and MRC ALL97 randomised trials. UK Medical Research Council's Working Party on Childhood Leukaemia." Leukemia **14**(3): 356-363.
- Harenberg, J. & Fenyvesi, T. (2004). "[Heparin, thrombin and Factor Xa inhibitors]." Hämostaseologie **24**(4): 261-278.
- Harris, J.M. & Chess, R.B. (2003). "Effect of pegylation on pharmaceuticals." Nat Rev Drug Discov **2**(3): 214-221.
- Haskell, C.M., Canellos, G.P., Leventhal, B.G., Carbone, P.P., Block, J.B., Serpick, A.A. & Selawry, O.S. (1969). "L-asparaginase: therapeutic and toxic effects in patients with neoplastic disease." N Engl J Med **281**(19): 1028-1034.
- Heit, J.A. (2003). "The potential role of direct thrombin inhibitors in the prevention and treatment of venous thromboembolism." Chest **124**(3 Suppl): 40-48.
- Hirsh, J., Warkentin, T.E., Shaughnessy, S.G., Anand, S.S., Halperin, J.L., Raschke, R., Granger, C., Ohman, E.M. & Dalen, J.E. (2001). "Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety." Chest **119**(1): 64-94.
- Ho, D.H., Brown, N.S., Yen, A., Holmes, R., Keating, M., Abuchowski, A., Newman, R.A. & Krakoff, I.H. (1986). "Clinical pharmacology of

- polyethylene glycol-L-asparaginase." Drug Metab Dispos **14**(3): 349-352.
- Hoffman, M. & Monroe, D.M. (2001). "A cell-based model of hemostasis." Thromb Haemost **85**(6): 958-965.
- Holcenberg, J.S. (1977). "Enzymes as drugs." Annu Rev Pharmacol Toxicol **17**: 97-116.
- Holowiecki, J., Giebel, S., Krawczyk, M. et al. (2003). "PEG-asparaginase as a part of induction therapy for adult acute lymphoblastic leukemia. A phase II study by the polish adult leukemia group (PALG). 45-th annual meeting of ASH, San Diego, USA." Blood **102**: 255.
- Homans, A.C., Rybak, M.E., Baglini, R.L. et al. (1987). "Effect of L-asparaginase administration on coagulation and platelet function in children with leukemia." J Clin Oncol **5**(5): 811-817.
- Hunault-Berger, M., Chevallier, P., Delain, M. et al. (2008). "Changes in antithrombin and fibrinogen levels during induction chemotherapy with L-asparaginase in adult patients with acute lymphoblastic leukemia or lymphoblastic lymphoma. Use of supportive coagulation therapy and clinical outcome: the CAPELAL study." Haematologica **93**(10): 1488-1494.
- Iwamoto, S., Mihara, K., Downing, J.R., Pui, C.H. & Campana, D. (2007). "Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase." J Clin Invest **117**(4): 1049-1057.
- Jackson, R.C. & Handschumacher R.E. (1970). "*Escherichia coli* L-asparaginase: catalytic activity and subunit nature." Biochemistry **9**(18): 3585-3590.
- Jaffe, N., Traggis, D., Das, L. et al. (1971). "Favourable induction rate with twice week doses of L-asparaginase." Cancer Res **33**(1): 1-4.
- Jamieson, G.A. (1997). "Pathophysiology of platelet thrombin receptors." Thromb Haemost **78**(1): 242-246.
- Jarrar, M., Gaynon, P.S., Periclou, A.P. et al. (2006). "Asparagine depletion after pegylated *E. coli* asparaginase treatment and induction outcome in children with acute lymphoblastic leukemia in

- first bone marrow relapse: a Children's Oncology Group study (CCG-1941)." Pediatr Blood Cancer **47**(2): 141-146.
- Johnston, P.G., Hardisty, R.M., Kay, H.E. & Smith, P.G. (1974). "Myelosuppressive effect of colaspase (L-asparaginase) in initial treatment of acute lymphoblastic leukaemia." Br Med J **3**(5923): 81-83.
- Jones, B., Holland, J.F., Glidewell, O. et al. (1977). "Optimal use of L-asparaginase (NSC-109229) in acute lymphocytic leukemia." Med Pediatr Oncol **3**(4): 387-400.
- Jorge, J.C., Perez-Soler, R., Morais, J.G. & Cruz, M.E. (1994). "Liposomal palmitoyl-L-asparaginase: characterization and biological activity." Cancer Chemother Pharmacol **34**(3): 230-234.
- Joseph, K., Tholanikunnel, B.G. & Kaplan, A.P. (2002). "Heat shock protein 90 catalyzes activation of the prekallikrein-kininogen complex in the absence of factor XII." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 896-900.
- Jürgens, H., Schwamborn, D., Korholz D. et al. (1988). "Klinische Erfahrungen mit polyethylen-gekoppelter *E. coli* Asparaginase bei Patienten mit ALL Mehrfachrezidiv." Klin Pädiatr **200**(3): 184-191.
- Kaminishi, H., Hamatake, H., Cho, T., Tamaki, T., Suenaga, N., Fujii, T., Hagihara, Y. & Maeda, H. (1994). "Activation of blood clotting factors by microbial proteinases." FEMS Microbiol Lett **121**(3): 327-332.
- Kamisaki, Y., Wada, H., Yagura, T. et al (1981). "Reduction in immunogenicity and clearance rate of *E. coli* L-asparaginase by modification with monomethoxypolyethylene glycol." J Pharmacol Exp Ther **216**(2): 387-400.
- Kaplan, A.P., Silverberg, M. & Ghebrehiwet, B. (1986). "The intrinsic coagulation/kinin pathway-the classical complement pathway and their interactions." Adv Exp Med Biol **198 Pt B**: 11-25.
- Kaplan, A.P. & Silverberg, M. (1987). "The coagulation-kinin pathway of human plasma." Blood **70**(1): 1-15.
- Kaplan, A.P. (1996). "Intrinsic coagulation, thrombosis, and bleeding." Blood **87**(5): 2090.

- Kaplan, A.P. & Ghebrehiwet, B. (2010). "The plasma bradykinin- forming pathway and its interrelationships with the complement." Mol Immunol **47**(13): 2161-2169.
- Keating, M.J., Holmes, R., Lerner, S. & Ho, D.H. (1993). "L-asparaginase and PEG asparaginase-past, present, and future." Leuk Lymphoma **10**(1): 153-157.
- Kidd, J.G. (1953a). "Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum." J Exp Med **98**(6): 565-582.
- Kidd, J.G. (1953b). "Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. II. Studies on the nature of the active serum constituent: histological mechanism of the regression: tests for effects of guinea pig serum on lymphoma cells in vitro: discussion." J Exp Med **98**(6): 583-606.
- Killander, D., Dohlwitz, A., Engstedt, L., et al. (1976). "Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia." Cancer **37**(1): 220-228.
- Kiriyama, Y., Kubota, M., Takimoto, T., Kitoh, T., Tanizawa, A., Akiyama, Y. & Mikawa, H. (1989). "Biochemical characterization of U937 cells resistant to L-asparaginase: the role of asparagine synthetase." Leukemia **3**(4): 294-297.
- Krishnaswamy, S. (1992). "Role of the membrane surface in the activation of human coagulation factor X." J Biol Chem **267**(36): 110-120.
- Kumar, V., Robbins, S.L. & Fausto, N. (2005). "Robbins and Cotran: Pathologic basis of disease." Philadelphia: Elsevier **7th edn**.
- Lanvers-Kaminsky (2006). "Preclinical and clinical aspects of asparaginase." EJHP Practice **12**(5): 461-467.
- Larson, R. A., Dodge, R. K., Burns, C.P. et al. (1995). "A five-drug remission induction regimen with intensive consolidation for adults with acute lymphoblastic leukemia: cancer and leukemia group B study 8811." Blood **85**(8): 2025-2037.

- Lawson, J.H., Kalafatis, M., Stram, S., Mann, K.G. (1994). "A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study." J Biol Chem **269**(37): 23357-23366.
- Leventhal, B.G. & Henderson, E.S. (1971). "Therapy of acute leukemia with drug combinations which include asparaginase." Cancer **28**(4): 825-829.
- Levi, M., De Jonge, E., Van der Poll, T. & Ten Cate, H. (1999). "Disseminated intravascular coagulation." Thromb Haemost **82**(2): 695-705.
- Mac Ewen, E.G., Rosenthal, R., Matus, R., Viau, A.T. & Abuchowski, A. (1987). "A preliminary study on the evaluation of asparaginase. polyethylene glycol conjugate against canine malignant lymphoma." Cancer **59**(12): 2011-2015.
- Maita, T. & Matsuda, G. (1980). "The primary structure of L-asparaginase from *Escherichia coli*." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **361**(2): 105-117.
- Mann, K.G., Brummel-Ziedins, K., Orfeo, T. & Butenas, S. (2006). "Models of blood coagulation." Blood Cells Mol Dis **36**(2): 108-117.
- Manning, G.B. (1957). "The asparagine deaminase of *Bacillus coagulans* and *Bacillus stearothermophilus*." Can J Microbiol **3**: 1001-1009.
- Martinelli, L. (2005). "Von Willebrand factor and factor VIII as risk factors for arterial and venous thrombosis." Semin Hematol **42**(1): 49-55.
- Martins, M.B., Jorge, J.C. & Cruz, M.E. (1990). "Acylation of L-asparaginase with total retention of enzymatic activity." Biochimie **72**(9): 671-675.
- Mashburn, L.T. & Wriston, J.C. (1964). "Tumor inhibitory effect of L-Asparaginase from *Escherichia coli*." Arch Biochem Biophys **105**: 450-452.
- Massicotte, P., Julian, J.A., Shields, K., et al (2003). "An open-label randomized controlled trial of low molecular weight heparin compared to heparin and coumadin for the treatment of venous thromboembolic events in children: the REVIVE trial." Thrombosis Res **109**(2-3): 85-92.

- Mattioli Belmonte, M., Gugliotta, L., Delvos, U., Catani, L., Vianelli, N., Cascione, M.L., Belardinelli, A.R., Mottola, L. & Tura, S. (1991). "A regimen for antithrombin III substitution in patients with acute lymphoblastic leukemia under treatment with L-asparaginase." Haematologica **76**(3): 209-214.
- Mauz-Korholz, C., Junker, R., Gobel, U. & Nowak-Göttl, U. (2000). "Prothrombotic risk factors in children with acute lymphoblastic leukemia treated with delayed *E. coli* asparaginase (COALL-92 and 97 protocols)." Thromb Haemost **83**(6): 840-843.
- medac GmbH, H. (2007). "Asparaginase medac." Fachinformation.
- Medved, L. & Nieuwenhuizen, W. (2003). "Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin." Thromb Haemost **89**(3): 409-419.
- Meister, B., Kropshofer, G., Klein-Franke, A., Strasak, A.M., Hager, J. & Streif, W. (2008). "Comparison of low-molecular-weight heparin and antithrombin versus antithrombin alone for the prevention of symptomatic venous thromboembolism in children with acute lymphoblastic leukemia." Pediatr Blood Cancer **50**(2): 298-303.
- Menache, D., Grossman, B.J. & Jackson, C.M. (1992). "Antithrombin III: physiology, deficiency, and replacement therapy." Transfusion **32**(6): 580-588.
- Michalska, K. & Jaskolski, M. (2006). "Structural aspects of L-asparaginases, their friends and relations." Acta Biochim Pol **53**(4): 627-640.
- Miller, H.K., Salser, J.S. & Balis, M.E. (1969). "Amino acid levels following L-asparagine amidohydrolase (EC.3.5.1.1) therapy." Cancer Res **29**(1): 183-187.
- Mitchell, L.G., Hoogendoorn, H., Giles, A.R., Vegh, P. & Andrew, M. (1994a). "Increased endogenous thrombin generation in children with acute lymphoblastic leukemia: risk of thrombotic complications in L-Asparaginase-induced antithrombin III deficiency." Blood **83**(2): 386-391.
- Mitchell, L.G., Halton, J.M., Vegh, P.A. et al (1994b). "Effect of disease and chemotherapy on hemostasis in children with acute lymphoid leukemia." Am J Pediatr Hematol Oncol **16**(2): 120-126.

- Mitchell, L.G., Sutor, A.H. & Andrew, M. (1995). "Hemostasis in childhood acute lymphoblastic leukemia: coagulopathy induced by disease and treatment." Semin Thromb Hemost **21**(4): 390-401.
- Moghrabi, A., Levy, D.E., Asselin, B. et al. (2007). "Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia." Blood **109**(3): 896-904.
- Monroe, D.M., Hoffman, M. & Roberts, H.R. (2002). "Platelets and thrombin generation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(9): 1381-1389.
- Moola, Z.B., Scawen, M.D. Atkinson, T. & Nicholls, D.J. (1994). "*Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes." Biochem J **302**(Pt 3): 921-927.
- Morrissey, J.H. (2010). "Proteinphospholipid interactions in blood clotting." Thromb Research **125**(Suppl 1): 23-25.
- Moser, M. (2008). "The role of thrombin in angiogenesis" Hämostaseologie **28**(4): 189-194.
- Mosesson, M.W. (2007). "Update on antithrombin I (fibrin)." Thromb Haemost **98**(1): 105-108.
- Mousa, S.A. (2010). "Novel anticoagulant therapy: principle and practice." Methods Mol Biol **663**: 157-159.
- Müller, H.J. & Boos, J. (1998). "Use of L-asparaginase in childhood ALL." Crit Rev Oncol Hematol **28**(2): 97-113.
- Müller, H.J., Loning, L. , Horn, A. et al. (2000). "Pegylated asparaginase (Oncaspar) in children with ALL: drug monitoring in reinduction according to the ALL/NHL-BFM 95 protocols." Br J Haematol **110**(2): 379-384.
- Müller, H.J., Beier, R., Loning, L. et al. (2001). "Pharmacokinetics of native *Escherichia coli* asparaginase (Asparaginase medac) and hypersensitivity reactions in ALL-BFM 95 reinduction treatment." Br J Haematol **114**(4): 794-799.
- Muss, H.B., Spell, N., Scudiery, D. et al. (1990). "A phase II trial of PEG-L-asparaginase in the treatment of non-Hodgkins lymphoma." Invest New Drugs **8**(1): 125-130.

- Naito, K. & Fujikawa, K. (1991). "Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces." J Biol Chem **266**(12): 7353-7358.
- Nakamura, N., Morikawa, Y. & Tanaka, M. (1971). "L-asparaginase from *E. coli*. Part II: substrate specificity studies." Agric Biol Chem **35**: 743-751.
- Naqi, A., De Loach, J.R., Andrews, K., Satterfield, W. & Keeling, M. (1988). "Determination of parameters for enzyme therapy using L-asparaginase entrapped in canine erythrocytes." Biotechnol Appl Biochem **10**(4): 365-372.
- Narta, U.K., Kanwar, S.S. & Azmi, W. (2007). "Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia." Crit Rev Oncol Hematol **61**(3): 208-221.
- Nerkar, D.P. & Gangadharan, M. (1989). "Modification of L-asparaginase from *Erwinia carotovora* using human serum albumin." Mol Biother **1**(3): 152-154.
- Nesbit, M., Chard, R., Evans, A., Karon, M. & Hammond, G.D. (1979). "Evaluation of intramuscular versus intravenous administration of L-asparaginase in childhood leukemia." Am J Pediatr Hematol Oncol **1**(1): 9-13.
- Nesheim, M.E., Taswell, J.B. & Mann, K.G. (1979). "The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase." J Biol Chem **254**(21): 10952-10962.
- Nesheim, M.E. (2003). "Thrombin and fibrinolysis." Chest **124**(3 Suppl): 33-39.
- Nowak-Göttl, U., Wolff, J.E.A., Kuhn, N., Boos, J., Kehrel, B., Lilienweiss, V., Schwabe, D. & Jürgens, H. (1994). "Enhanced thrombin generation, P-von Willebrand Factor, P-fibrin, D-dimer and P-plasminogen activator inhibitor 1: predictive for venous thrombosis in L-asparaginase treated children." Fibrinolysis **8**(2): 63-65.
- Nowak-Göttl, U., Rath, B., Binder, M., Hassel, J.U., Wolff, J., Husemann, S. & Ritter, J. (1995a). "Inefficacy of fresh deficiencies during ALL induction therapy." Haematologica **80**(5): 451-453.

- Nowak-Göttl, U., Aschka, L., Koch, H.G. et al (1995b). "Resistance to activated protein C (APCR) in children with acute lymphoblastic leukaemia-the need for a prospective multicentre study." Blood Coagul Fibrinolysis **6**(8): 761-764.
- Nowak-Göttl, U., Werber, G., Ziemann, D., Ahlke, E. & Boos, J. (1996). "Influence of two different *Escherichia coli* asparaginase preparations on fibrinolytic proteins in childhood ALL." Haematologica **81**(2): 127-131.
- Nowak-Göttl, U., Ahlke, E., Schulze-Westhoff, P. & Boos, J. (1996). "Changes in coagulation and fibrinolysis in childhood ALL: a two-step dose reduction of one *E. coli* asparaginase preparation." Br J Haematol **95**(1): 123-126.
- Nowak-Göttl, U., Ahlke, E., Klosel, K., Jurgens, H. & Boos, J. (1997). "Changes in coagulation and fibrinolysis in childhood acute lymphoblastic leukaemia re-induction therapy using three different asparaginase preparations." Eur J Pediatr **156**(11): 848-850.
- Nowak-Göttl, U., Ahlke, E., Fleischhack, G., Schwabe, D., Schobess, R., Schumann, C. & Junker, R. (2003). "Thromboembolic events in children with acute lymphoblastic leukemia (BFM protocols): prednisone versus dexamethasone administration." Blood **101**(7): 2529-2533.
- Oettgen, H.F., Old, L.J., Boyse, E.A., Campbell, H.A., Philips, F.S., Clarkson, B.D., Tallal, L., Leeper, R.D., Schwartz, M.K. & Kim, J.H. (1967). "Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase." Cancer Res **27**(12): 2619-2631.
- Oettgen, H.F., Stephenson, P.A., Schwartz, M.K. et al. (1970). "Toxicity of *E. coli* L-asparaginase in man." Cancer **25**(2): 253-278.
- Ohnuma, T., Holland, J.F., Freeman, A & Sinks, L.F. (1970). "Biochemical and pharmacological studies with asparaginase in man." Cancer Res **30**(9): 2297-2305.
- Ortega, J.A., Nesbit, M.E., Donaldson, M.H., Hittle, R.E., Weiner, J., Karon, M. & Hammond, D. (1977). "L-Asparaginase, vincristine, and prednisone for induction of first remission in acute lymphocytic leukemia." Cancer Res **37**(2): 535-540.

- Osterud, B. & Rapaport, S.L. (1977). "Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5260-5264.
- Ott, N., Ramsay, N.K., Priest, J.R., Lipton, M., Pui, C.H., Steinherz, P. & Nesbit, M.E. (1988). "Sequelae of thrombotic or hemorrhagic complications following L-asparaginase therapy for childhood lymphoblastic leukemia." Am J Pediatr Hematol Oncol **10**(3): 191-195.
- Page, D.A. (2009). "Change designation of clotting factors to Arabic numerals." J Thromb Haemost **7**(9): 1599.
- Papageorgiou, A.C., Posypanova, G.A., Andersson, C.S., Sokolov, N.N. & Krasotkina, J. (2008). "Structural and functional insights into *Erwinia carotovora* L-asparaginase." FEBS J **275**(17): 4306-4316.
- Park, Y.K., Abuchowski, A., Davis, S. & Davis, F. (1981). "Pharmacology of *Escherichia coli* L-asparaginase polyethylene glycol adduct." Anticancer Res **1**(6): 373-376.
- Payne, J.H. & Vora, A.J. (2007). "Thrombosis and acute lymphoblastic leukaemia." Br J Haematol **138**(4): 430-445.
- Piatkowska-Jakubas, B., Krawczyk-Kulis, M., Giebel, S., Adamczyk-Cioch, M., Czyz, A., Lech Maranda, E., Paluszewska, M., Palynyczko, G., Piszcz, J. & Holowiecki, J. (2008). "Use of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia: recommendations of the Polish Adult Leukemia Group." Pol Arch Med Wewn **118**(11): 664-669.
- Pinheiro, J.P. & Boos, J. (2004). "The best way to use asparaginase in childhood acute lymphatic leukaemia-still to be defined?" Br J Haematol **125**(2): 117-127.
- Prager, M.D. & Bachynsky, N (1968). "Asparagine synthetase in asparaginase resistant and susceptible mouse lymphomas." Biochem Biophys Res Commun **31**(1): 43-47.
- Pratt, C.B., Simone, J.V., Zee, P., Aur, R.J. & Johnson, W.W. (1970). "Comparison of daily versus weekly L-asparaginase for the treatment of childhood acute leukemia." J Pediatr **77**(3): 474-483.

- Priest, J.R., Ramsay, N.K., Bennett, A.J., Krivit, W. & Edson, J.R. (1982). "The effect of L-asparaginase on antithrombin, plasminogen, and plasma coagulation during therapy for acute lymphoblastic leukemia." J Pediatr **100**(6): 990-995.
- Ramya L.N., Doble, M., Rekha, V.P. & Pulicherla, K.K. (2012). "L- Asparaginase as potent anti-leukemic agent and its significance of having reduced glutaminase side activity for better treatment of acute lymphoblastic leukemia". Appl Biochem Biotechnol DOI 10.1007/s12010-012-9755-z
- Riccardi, R., Holcenberg, J.S., Glaubiger, D.L., Wood, J.H. & Poplack, D.G. (1981). "L-asparaginase pharmacokinetics and asparagine levels in cerebrospinal fluid of rhesus monkeys and humans." Cancer Res **41**(11 Pt 1): 4554-4558.
- Risseeuw-Appel, L.M., Dekker, L., Hop, W.C. & Hahlen, K. (1994). "Minimal effects of *E. coli* and *Erwinia* asparaginase on the coagulation system in childhood acute lymphoblastic leukemia: a randomized study." Med Pediatr Oncol **23**(4): 335-343.
- Rizzari, C., Citterio, M., Zucchetti, M., Conter, V., Chiesa, R., Colombini, A., Malguzzi, S., Silvestri, D. & D'Incalci, M. (2006). "A pharmacological study on pegylated asparaginase used in front-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia." Haematologica **91**(1): 24-31.
- Rosen, O., Müller, H.J., Gokbuget, N. et al. (2003). "Pegylated asparaginase in combination with high-dose methotrexate for consolidation in adult acute lymphoblastic leukaemia in first remission: a pilot study." Br J Haematol **123**(5): 836-841.
- Rosing, J., Van Rijn J.L., Bevers, E.M., Van Dieijen, G., Comfurius, P. & Zwaal, R.F. (1985). "The role of activated human platelets in prothrombin and factor X activation." Blood **65**(2): 319-332.
- Röhm, K.H. & Van Etten R.L. (1986). "The ¹⁸O isotope effect in ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy: mechanistic studies on asparaginase from *Escherichia coli*." Arch Biochem Biophys **244**(1): 128-136.

- Rytting, M. (2010). "Peg-asparaginase for acute lymphoblastic leukemia" Expert Opin Biol Ther **10**(5):833-9.
- Schellekens, H. (2002). "Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects." Clin Ther **24**(11): 1720-1740; discussion 1719.
- Schrapppe, M., Reiter, A., Zimmermann, M., Harbott, J., Ludwig, W.D., Henze, G., Gadner, H., Odenwald, E. & Riehm, H. (2000). "Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Münster." Leukemia **14**(12): 2205-2222.
- Schwartz, M.K. (1970). "The distribution and clearance of L-asparaginase." Recent Results Cancer Res **33**: 58-63.
- Shapiro, R.S., Gerrard, J.M., Ramsay, N.K. et al. (1980). "Selective deficiency in collagen-induced platelet aggregation during L-Asparaginase therapy." Am J Pediatr Hematol Oncol **2**(3): 207-212.
- Silverman, L.B., Gelber, R.D., Dalton, V.K. et al. (2001). "Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01." Blood **97**(5): 1211-1218.
- Smith, S.A., Mutch, N.J., Baskar, D., Rohloff, P., Docampo, R. & Morrissey, J.H. (2006). "Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(4): 903-908.
- Spronk, H.M., Govers-Riemslog, J.W. & Ten Cate, H. (2003). "The blood coagulation system as a molecular machine." Bioessays **25**(12): 1220-1228.
- Stief, T.W. (2006a). "Specific determination of plasmatic thrombin activity." Clin Appl Thromb Haemost **18**(26): 324-329.
- Stief, T.W. (2006b). "Thrombin generation by exposure of blood to endotoxin- a simple model to study DIC." Clin Appl Thrombosis/Hemostasis **12**(2): 137-161
- Stief, T.W. (2007). "Inhibition of thrombin generation in recalcified plasma." Blood Coagulation and Fibrinolysis **18**(8): 751-760.

- Stief, T.W. (2008a). "The laboratory diagnosis of the pre-phase of pathologic disseminated intravascular coagulation." Hemostasis Laboratory **1**: 137-152.
- Stief, T.W., S. Ajib, Renz, H. (2008b). "The sensibility of individual plasma to heparins." Hemostasis laboratory **1**: 143-157.
- Stief, T.W. (2008c). "Innovative tests of plasmatic hemostasis." Laboratory Medicine **39**(4): 225-230.
- Stief, T.W. (2009). "Pathological thrombin generation by the synthetic inhibitor argatroban." Hemostasis Laboratory **2**: 83-104.
- Stief, T.W. (2012a). "Thrombin-applied clinical biochemistry of the main factor of coagulation. In: Thrombin: function and pathophysiology. Stief T, ed; Nova science publishers; New York; pp. VII-XX
- Stief, T.W. (2012b). "LMWH-action-monitoring for all patients". Acta Paediatrica DOI: 10.1111/j.1651.2227.2012.02712.x
- Stouffer, G.A. & Runge, M. S. (1998). "The role of secondary growth factor production in thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells." Semin Thromb Hemost **24**(2): 145-150.
- Sutor, A.H., Niemeyer, C., Sauter, S. et al. (1992). "Gerinnungsveränderungen bei Behandlung mit den Protokollen ALL-BFM-90 und NHL-BFM-90." Klin Pädiatr **204**(4): 264-273.
- Swain, A.L., Jaskólski, M., Housset, D. et al. (1993). "Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy." Biochemistry **90**(4): 1474-1478.
- Tallal, L., Tan, C. Oettgen, H., Wollner, N., Mc Carthy, M., Helson, L., Burchenal, J., Karnofsky, D. & Murphy, M.L. (1970). "*E. coli* L-asparaginase in the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children." Cancer **25**(2): 306-320.
- Tanaka, K.A., Key, N.S. & Levy, J.H. (2009). "Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation." Anesth Analg **108**(5): 1433-1446.
- Tracy, P.B., Eide, L.L. & Mann, K.G. (1985). "Human prothrombinase complex assembly and function on isolated peripheral blood cell populations." J Biol Chem **260**(4): 2119-2124.

- Trueworthy, R.C., Sutow, W.W., Pullen, J., Komp, D. & Berry, D.H. (1978). "Repeated use of L-asparaginase in multi-drug therapy of childhood leukemia." Med Pediatr Oncol **4**(2): 91-97.
- Uren, J.R. (1977). "Enzyme therapy. In: Becker FF, editor. Cancer: A comprehensive treatise." New York: Plenum Press 487-557.
- Uren, J.R. & Ragin, R.C. (1979). "Improvement in the therapeutic, immunological, and clearance properties of *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora* L-asparaginases by attachment of poly-DL-alanyl peptides." Cancer Res **39**(6 Pt 1): 1927-1933.
- Van den Berg, H. (2011). "Asparaginase revisited". Leuk Lymphoma. **52**(2):168-78.
- Van Hylckama Vlieg, A., Van der Linden, I.K., Bertina, R.M. & Rosendaal, F.R. (2000). "High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis." Blood **95**(12): 3678-3682.
- Van Veen, J.J., Gatt, A. & Makris, M. (2008). "Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet?" Br J Haematol **142**(6): 889-903.
- Verma, N., Kumar, K., Kaur, G., Anand, S. (2007). "L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent." Crit Rev Oncol Hematol **27**(1): 45-62.
- Veronese, F.M. & Mero, A. (2008). "The impact of PEGylation on biological therapies." BioDrugs **22**(5): 315-329.
- Vieira Pinheiro, J.P., Müller, H.J., Schwabe, D., Gunkel, M., Casimiro da Palma, J., Henze, G., Von Schutz, V., Winkelhorst, M., Wurthwein, G. & Boos, J. (2001). "Drug monitoring of low-dose PEG-asparaginase (Oncaspar) in children with relapsed acute lymphoblastic leukaemia." Br J Haematol **113**(1): 115-119.
- Von dem Borne, P.A., Meijers, J.C. & Bouma, B.N. (1995). "Feedback activation of factor XI by thrombin in plasma results in additional formation of thrombin that protects fibrin clots from fibrinolysis." Blood **86**(8): 3035-3042.
- Walsh, P.N. (2001). "Roles of platelets and factor XI in the initiation of blood coagulation by thrombin." Thromb Haemost **86**(1): 75-82.

- Whelan, H.A. & Wriston, J.C. (1969). "Purification and properties of asparaginase from *Escherichia coli* ." Biochemistry **8**(6): 2386-2393.
- Winkler, A.M., Sheppard, C.A. & Frantz, C.R. (2007). "Laboratory monitoring of heparin: challenges and opportunities." Labmedicine **38**: 499-502.
- Wriston, J.C. (1985). "Asparaginase." Methods Enzymol **113**: 608-618.
- Wriston, J.C. & Yellin, T.O. (1973). "L-asparaginase: a review." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **39**: 185-248.
- Yellin, T.O. & Wriston, J.C. (1966a). "Antagonism of purified asparaginase from guinea pig serum toward lymphoma." Science **151**(713): 998-999.
- Yellin, T.O. & Wriston, J.C. (1966b). "Purification and properties of guinea pig serum asparaginase." Biochemistry **5**(5): 1605-1612.
- Zeidan, A., Wang, E.S., Wetzler, M. (2009). "Pegasparaginase: where do we stand?" Expert Opin Biol Ther **9**(1): 111-119.
- Zubrod, C.G. (1970). "The clinical toxicities of L-asparaginase in treatment of leukemia and lymphoma." Pediatrics **45**(4): 555-559.

8. Anhang

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Danuta Chalkitis
Geboren am:	14.04.1986 in Bottrop
Familienstand:	ledig
Religionszugehörigkeit:	römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

Schulbildung

- | | |
|-------------------|---|
| • Grundschule: | Goetheschule Bottrop (1992 - 1996) |
| • Gymnasium: | Heinrich-Heine Gymnasium (1996 – 2005) |
| • Schulabschluss: | Abitur am Heinrich-Heine Gymnasium Bottrop
(25. Juni 2005) |

Hochschulstudium

- | | |
|------------------------|--|
| • Fach: | Humanmedizin |
| • Universität: | Philipps-Universität Marburg |
| • Studienbeginn: | Wintersemester 2005/06 |
| • Abgelegte Prüfungen: | 1. Staatsexamen (Physikum)
am 17. September 2007

2. Staatsexamen am 23. Mai 2012 |

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Aumüller, Bals, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Baumann, Becker, Behr, Bette, Beyer, Cetin, Czubayko, Daut, Del Rey, Dietrich, Dinges, Donner-Banzhoff, Duda, Eilers, Feiber, Feuser, Franz, Funck, Gassmann, Gerdes, Geks, Geyer, Görg, Gress, Grimm, Grundmann, Grzeschnik, Happle, Hassan, Henzel, Hermann-Lingen, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoos, Hoyer, Kann, Kalder, Keller, Kill, Kim-Berger, Klaus Klose, König, Koolmann, Kraft, Krause, Krieg, Kroll, Krones, Kuhlmann, Kühnert, Lang, Lemke, Leonhardt Lill, Löffler, Lohhoff, Lübbe, Lüers, Maier, Maisch, Max, Moosdorf, Moll, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Oertel, Pagenstecher, Plant, Prinz, Ramaswamy, Rausch, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Roelke, Röper, Rosenow, Rothmund, Ruchholz, Rudolph, Schade, Schäfer, Schlosser, Schmitt, Schnabel, Schofer, Schuster, Sommer, Schrader, Schmidt, Schulze, Seitz, Seyberth, Seyfarth, Steiniger, Stief, Stiller, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Waldegger, Weihe, Welter, Werner, Westermann, Wilhelm, Willeke, Wulf.

Danksagung

An allererster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. Stief für die einmalige Zusammenarbeit, hervorragende Betreuung und enorme Hilfsbereitschaft bedanken. Ohne meinen Doktorvater wäre die Durchführung und Erstellung dieser Arbeit nicht mal ansatzweise möglich gewesen.

Herr PD Dr. med. Stief hat es innerhalb kürzester Zeit geschafft, mich hervorragend in die laboranalytische Arbeit einzuführen und mich stark dafür zu begeistern. Nie fühlte ich mich alleine gelassen.

Einen respektvolleren, geduldigeren, motivierteren und engagierteren Doktorvater hätte man sich in der Tat nicht wünschen können. Mit einer Selbstverständlichkeit allzeit bereit, jederzeit ansprechbar, immer schnell zur Stelle und für Rückfragen stets verfügbar.

Ebenfalls möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes für Klinische Chemie danken, die mich unterstützt und von Anfang an im Labor integriert haben. Um diese Arbeit zu Papier zu bringen, möchte ich mich herzlich für die große Motivationsspritze durch meine „Motivase“ Siegfried bedanken, der mich während meines gesamten Studiums liebevoll begleitet hat, immer wieder motiviert, an mich geglaubt und mich wie immer genau zum richtigen Zeitpunkt dazu animiert hat, diese Arbeit zügig fertigzustellen.

Aufrichtiger Dank gilt vor allem auch Martin, Pantelis, Maria, Iulius und Frau Rhode für das Einführen in die Welt von Word, Excel, Grafikprogrammen und Endnote Web.

Nicht zu vergessen meine männlichen Computerexperten Marcus, Martin, Pansho, Adjanth, in dessen Zimmer ich mich wie zu Hause fühlen durfte und dessen Computer uneingeschränkt zu meiner Verfügung standen. Für die umsichtige Versorgung während des Schreibens meiner Arbeit möchte ich mich vor allem bei meiner Familie, Milanka, Marc und meinen ehemaligen Schlossmitbewohnern Martin, Sandra und Renate bedanken. Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Kommilitonen Johannes, Sebastian und Doro für ihre Hilfe beim Erstellen dieser Arbeit bedanken. Besonderer Dank gilt meinem großen Bruder, der einfach jederzeit für mich da war und auf den immer Verlass ist. Zudem möchte ich mich für

die langjährige einmalige Unterstützung meiner Freundin Ramona während des gesamten klinischen Studienabschnitts bedanken.

Unvergesslich bleibt auch der andauernde Ansporn von meiner lieben Freundin Maria, die mich immer wieder motiviert und aufgebaut hat. Des Weiteren hat Hayat-Leyla mit ihren inspirierenden Emails, blitzschnellen Verbesserungen und großen Flexibilität über den gesamten Zeitraum in einer einzigartigen Art und Weise stets für den nötigen Anschwung gesorgt.

Meinen Korrekturlesern Günther, Angelika, Eva, Pantelis, Martin, Hannan, möchte ich für Ihre enorme Geduld, Hilfsbereitschaft und Selbstverständlichkeit danken, die sie an den Tag gelegt haben.

Mein innigster und herzlichster Dank gebührt ausdrücklich meinen ununterbrochenen, liebevollen, fürsorgenden, einmaligen sowie motivierenden Unterstützern Frita, Mausio und Wurstillia. Ohne sie wären der erfolgreiche Abschluss meines Studiums und diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Zuletzt erwähnen möchte ich meinen Klinikengel Sylvia. Ohne sie hätte ich meine Arbeit, geschweige denn mein Studium nie so abwechslungsreich verwirklichen können. Sie hat mit ihrer kontinuierlichen Unterstützung sicherlich über Jahre Meisterarbeit geleistet.

„Und wenn du denkst es geht nicht mehr,
kommt von irgendwo ein Lichtlein her“.

Ich bedanke mich für jedes einzelne Lichtlein, dass mir beim Erstellen dieser Arbeit über den Weg gelaufen ist, mich tatkräftig unterstützt hat, meine schlechten Launen und zeitweilig ein wenig überstrapazierte Nerven toleriert hat, mir Ideen, konstruktive Kritik gegeben hat und so uneingeschränkt zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen hat.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Thrombin-Generierung durch Asparaginase“ im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Marburg (Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz) unter der Anleitung und Unterstützung von PD Dr. med. T. Stief ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischem Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- Stief TW, Chalkitis D. Asparaginase modulates thrombin generation. *Hemostasis Laboratory* 2008; 1: 303-66.
- Stief TW, Chalkitis D. Asparaginase may trigger thrombin generation. *Hemostasis Laboratory* 2009; 2: 137-94.
- Stief TW, Chalkitis D. Enoxaparin prevents excessive thrombin generation triggered by asparaginase. *Hemostasis Laboratory* 2009; 2: 195-203.
- Stief TW, Chalkitis D. PEGylated Asparaginase and thrombin generation. *Hemostasis Laboratory* 2009; 2: 349-62.

Marburg, den 24. September 2012